

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie



Martina Mikulů

Studium interakcí proteinkinasy CaMKK2 s kalmodulinem pomocí
fluorescenční spektroskopie
Study of interactions between protein kinase CaMKK2 and calmodulin
using fluorescence spectroscopy

Typ závěrečné práce:
Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V dne

Podpis autora

Poděkování

Děkuji svému školiteli, prof. RNDr. Tomášovi Obšilovi, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení práce.

Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře za ochotu a trpělivost vůči mým dotazům a za vytvoření příjemného prostředí při práci.

Také děkuji svým rodičům a prarodičům za podporu při studiu.

Abstrakt

Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasy jsou členy významné CaMK rodiny, která se účastní CaMK kaskády. Jedním z nich je Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasa 2 (CaMKK2), která je aktivována vazbou komplexu Ca^{2+} /CaM. CaMKK2 se od většiny ostatních proteinkinas liší zejména strukturou v blízkosti αE -helixu a autoinhibiční domény.

Protože se autoinhibiční doména překrývá s Ca^{2+} /CaM-vazebnou doménou, lze předpokládat, že vazba kalmodulinu způsobuje strukturní změny v oblastech interagujících s autoinhibiční doménou a ovlivňuje přístupnost těchto oblastí pro jiné molekuly. Pro ověření tohoto předpokladu byl exprimován a vypurifikován mutant CaMKK2 W445F, v jehož sekvenci se nachází pouze jeden tryptofanový zbytek na pozici 374, který se nachází v blízkosti sledované oblasti helixu αE . Strukturní změny v této oblasti byly pozorovány prostřednictvím zhášení intenzity fluorescence tryptofanového zbytku Trp³⁷⁴ prostřednictvím akrylamidu. Tato měření mohou poskytnout informaci o přístupnosti sledované oblasti. Porovnání zhášení fluorescence v přítomnosti a nepřítomnosti kalmodulinu naznačilo, že při interakci CaMKK2 s kalmodulinem dochází ve sledované oblasti v blízkosti Trp³⁷⁴ ke strukturní změně.

Abstract

Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinases are members of CaMK family, which is involved in CaMK cascade. One of CaMK family members is Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase 2 (CaMKK2), which is activated by Ca^{2+} /CaM-binding. There are some structural differences between CaMKK2 and other protein kinases, one of them is a structure near αE -helix and autoinhibitory domain.

Due to the overlap of autoinhibitory domain and Ca^{2+} /CaM-binding domain it can be supposed that Ca^{2+} /CaM-binding induces structural changes near autoinhibitory domain and thus can affect the accessibility of this region. CaMKK2 W445F mutant, which contains only one tryptophane residue Trp³⁷⁴ close to the αE -helix, was expressed and purified. Structural changes in this region were monitored using tryptophan fluorescence intensity quenching experiments, which can provide information about the accessibility of region surrounding tryptophan residue. The fluorescence of Trp³⁷⁴ was quenched using acrylamide. Comparison of fluorescence quenching experiments performed in the presence and absence of calmodulin suggests that the complex formation induces structural change in the region surrounding Trp³⁷⁴.

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1 Literární úvod	9
1.1 CaMKK2	9
1.1.1 Struktura a aktivace	9
1.1.2 CaMK Signální dráha	12
1.1.3 Biologická role CaMKK2 v živých organismech	15
1.2 Fluorescence	17
1.2.1 Fluorescence biomolekul	19
1.2.2 Zhášení fluorescence	20
2 Cíl práce	23
3 Materiál a metody	24
3.1 Materiál	24
3.1.1 Chemikálie	24
3.1.2 Přístroje	24
3.1.3 Ostatní materiál	25
3.2 Expres CaMKK2 W445F mutantu (CaMKK2 W374)	26
3.2.1 Sonikace	27
3.3 Purifikace CaMKK2 W374	27
3.3.1 Niklová chelatační chromatografie	27
3.3.2 Dialýza	28
3.3.3 Měření koncentrace proteinu	28
3.3.4 Štěpení TEV proteasou	29
3.3.5 Gelová permeační chromatografie	29
3.4 Expres CaM	29
3.4.1 Sonikace	30
3.5 Purifikace CaM	30
3.5.1 Chromatografie na fenyl-sepharose	30
3.5.2 Gelová permeační chromatografie	31
3.6 Expres TEV proteasy	32
3.6.1 Sonikace	32
3.7 Purifikace TEV proteasy	32
3.8 SDS-PAGE	33
3.8.1 Příprava vzorků a jejich analýza	34
3.8.2 Vizualizace gelů	35
3.9 Měření přístupnosti Trp ³⁷⁴ pomocí zhašení stacionární tryptofanové fluorescence akrylamidem	35
3.9.1 Příprava vzorků	35
3.9.2 Měření zhašení fluorescence	36
3.10 Vyhodnocení výsledků	36
4 Výsledky	38
4.1 Purifikace CaMKK2 W374	38
4.1.1 Niklová chelatační chromatografie	38
4.1.2 Štěpení TEV proteasou	38
4.1.3 Gelová permeační chromatografie	39
4.2 Purifikace CaM	40

4.2.1	Chromatografie na fenyl-sepharose	40
4.2.2	Gelová permeační chromatografie	41
4.3	Purifikace TEV proteasy	42
4.4	Měření excitačních a emisních spekter CaMKK2 W374 mutantu	43
4.5	Měření přístupnosti Trp ³⁷⁴ pomocí zhášení stacionární tryptofanové fluorescence akrylamidem	44
5	Diskuse	46
6	Závěr	47

Seznam použitých zkratek

AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkinasa
APS	peroxodisíran amonný
CaM	kalmodulin
CaMK	Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasa
CaMKK	Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinaskinasa
DTT	1,4-dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
His	histidin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB médium	médium podle Luria-Bertani
MLCK	myosin light-chain kinasa
MWCO	molecular weight cut-off
OD	optická hustota
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
Phe	fenylalanin
PKA	proteinkinasa A
PKB	proteinkinasa B
rpm	otáčky za minutu
Ser	serin
SDS	dodecylsíran sodný
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	tetramethylethylendiamin
TEV proteasa	Tobacco etch virus proteasa
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
β ME	β -merkapt ethanol

1 Literární úvod

1.1 CaMKK2

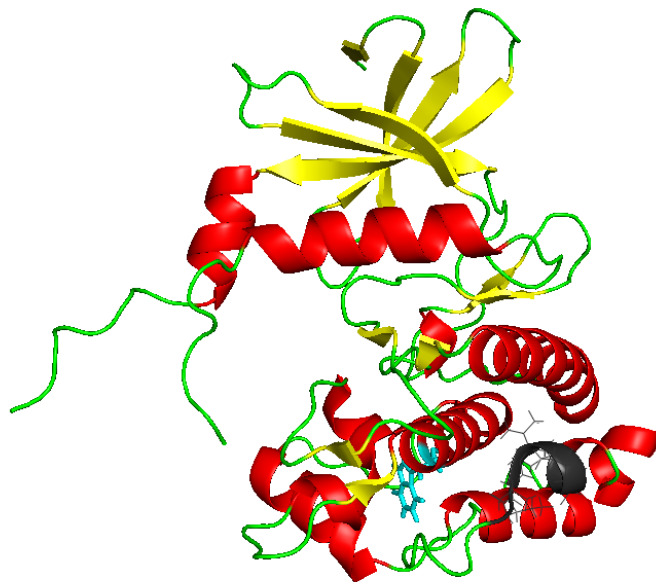
Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasakinas 2 (CaMKK2, z *angl. calcium/calmodulin dependent kinase kinase 2*) je členem rodiny Ca^{2+} /kalmodulin dependentních kinas (CaMK rodina), která představuje řadu enzymů uplatňujících se v mnoha procesech, například v genové transkripci, přeměnách cytoskeletu, učení a utváření paměti, nebo řízení apoptózy [1], [2]. Za první důkaz o kinasové aktivitě se považuje fosforylace kaseinu částečně vypurifikovaným vzorkem proteinu, kterou v roce 1954 provedli Burnett a Kennedy [3]. První struktura kinas, konkrétně krystalová struktura kinasové domény cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA), byla objasněna v roce 1991 [4], a tato kinas je v současnosti nejlépe prozkoumanou kinasou a je považována za vzor pro strukturu a funkci kinas.

Členové CaM-kinasové rodiny jsou klasifikováni jako Ser/Thr kinas, jejichž fosforylační místa jsou postranní řetězce serinu nebo threoninu. Nejvýznamnějšími členy CaMK rodiny jsou CaMKK, CaMKI a CaMKIV, které jsou součástí CaMK kaskády. Existují však i další Ca^{2+} /CaM-dependentní proteinkinasy např. CaMKII, CaMKIII nebo MLCK (z *angl. myosin light-chain kinase*). Jednotlivé CaM-kinasy jsou široce multifunkční a mají několik různých substrátů. Výjimkou je CaMKIII, jejíž jediným substrátem je elongační faktor 2 (EF2) [5].

V cytoplazmě a buněčném jádru savců se vyskytují dvě isoformy Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasy, označované jako CaMKK1 a CaMKK2 [6].

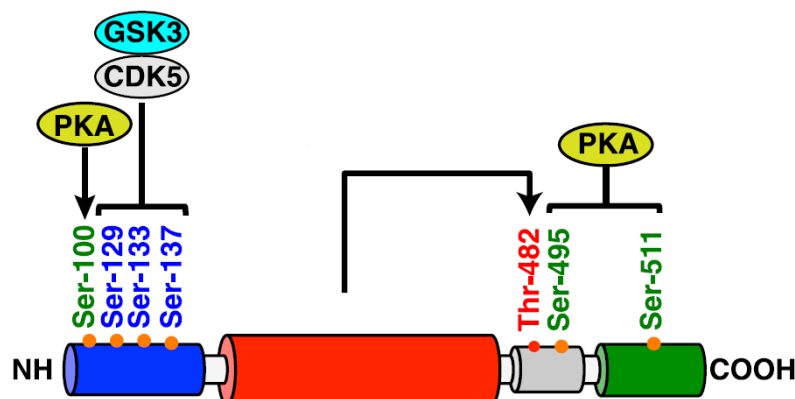
1.1.1 Struktura a aktivace

Krystalová struktura CaMKK2 (obrázek 1) byla poprvé objasněna v komplexu s jejím inhibitem označovaným jako STO-609 v roce 2009 [6].



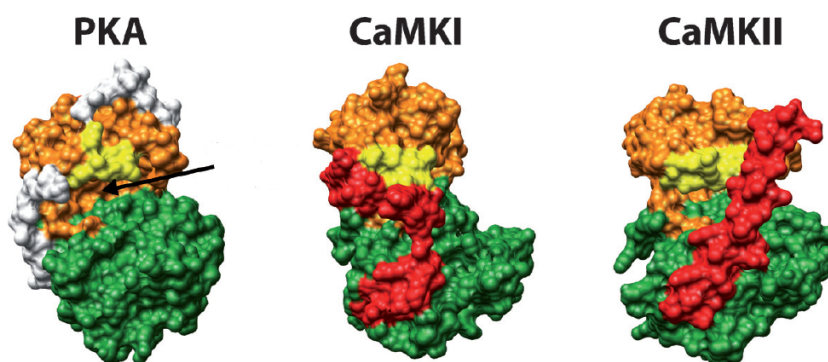
Obrázek 1: Krystalová struktura CaMKK2. Červenou barvou zobrazeny α -helixy, žlutou barvou β -struktury, zelenou barvou smyčky. Tyrkysovou barvou je zvýrazněn pozorovaný Trp^{374} , šedou barvou autoinhibiční doména. Vizualizace vytvořena v programu PyMol za použití struktury převzaté z PDB databáze (PDB ID: 5UY6) [7].

CaMKK2 se skládá ze čtyř hlavních domén (obrázek 2). Jsou to N-koncová a C-koncová doména, centrální Ser/Thr kinasová doména a regulační doména. Regulační doména je tvořena Ca^{2+} /CaM vazebnou doménou a autoinhibiční doménou, které se navzájem překrývají [8]. Tento překryv způsobuje, že vazba Ca^{2+} /CaM komplexu ovlivňuje autoinhibiční doménu a aktivuje tak protein [2]. Tuto strukturu mají i další členové CaMK kaskády, CaMKI a CaMKIV [9], [6].



Obrázek 2: Schematicky znázorněná struktura CaMKK2. N-koncová doména je zobrazena modře, kinasová doména červeně, regulační doména šedě a C-koncová doména zeleně. Oranžovými tečkami jsou zobrazena fosforylační místa. Převzato z [10].

Všechny proteinkinasy sdílí podobný strukturní motiv, kterou je konzervovaná oblast cca 250 aminokyselin, tzv. kinasová doména. Kinasová oblast je zodpovědná za základní podobu struktury, kterou sdílí všechny známé kinasy, tedy za dvoulobkovou katalytickou (kinasovou) doménu skládající se z ATP-vazebné domény a substrát-vazebné domény, které jsou propojené malou spojovací oblastí [11] (obrázek 3). Tato oblast umožňuje otvírání a zavírání struktury během různých fází katalytického cyklu [12].



Obrázek 3: Podobnost struktur PKA, CaMKI a CaMKII. Šipkou je označeno katalytické místo PKA. Převzato z [2].

Primární sekvence CaMKK2 vykazuje pouze 30–40% podobnost sekvence kinasové domény s ostatními členy CaMK rodiny [13]. Kinasová doména CaMKK obsahuje dvě jedinečné odlišnosti vůči kinasovým doménám dalších enzymů. Jsou jimi chybějící konzervovaná kyselá residua v katalytických subdoménách V a VI, a tzv. RP-insert, což je oblast bohatá na aminokyseliny arginin a prolin [9].

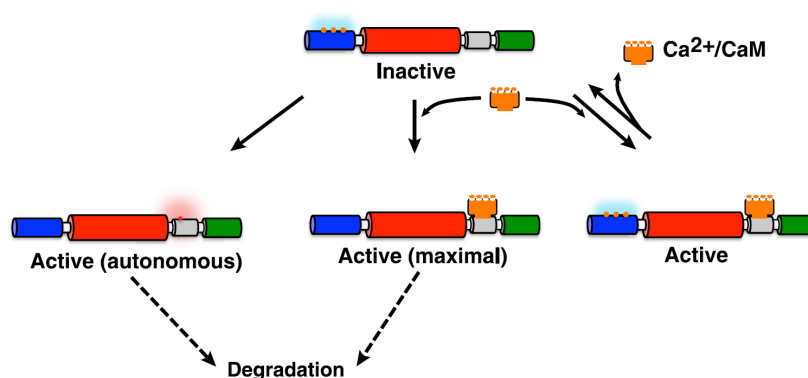
Absence kyselých aminokyselinových zbytků způsobuje, že CaMKK nedokáže rozpoznat bazické oblasti primární sekvence fosforylačních míst CaMKI a CaMKIV [9].

RP-insert se nachází mezi substrát-vazebným a ATP-vazebným místem kinasové domény [13] a je důležitý pro rozpoznání substrátu [9]. Nepřítomnost RP-insertu zabraňuje aktivaci CaMKI a CaMKIV, nicméně nedochází ke snížení substrátové afinity vůči PKB. Delece nebo mutace RP-domény neovlivňuje autofosforylaci, fosforylaci peptidu ani vazbu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [1].

Dalším rozdílem ve struktuře je, že ačkoliv se kinasová doména CaMKK2 skládá do tvaru typického pro proteinkinasy, v místě 274-284 se vyskytuje hydrofobní $\beta 5$ - α E-smyčka místo α D-helixu, který se nachází v ostatních proteinkinasech [6].

Aktivace mnoha proteinových kinas je podmíněná fosforylací tzv. aktivační smyčky. CaMKK obsahuje v místě aktivační smyčky fosforylační serinová a threoninová místa. Z krystalové struktury CaMKK2·STO-609 komplexu vyplývá, že aktivační místo zaujímá aktivní strukturu i v případě nefosforylovaných serinových a threoninových zbytků. Aktivní struktura je stabilizována mnoha intramolekulárními interakcemi. Jednou z nich je vodíková vazba mezi aminokyselinovými zbytky Leu³⁰⁹ a Asn³³⁵, která vytváří krátký antiparalelní β -sheet v příslušném místě. Také je stabilizována vodíkovou vazbou mezi aminokyselinami Glu²³⁶ a Lys¹⁹⁴, jejíž stabilita je podmíněna interakcí Phe³³¹ residua s α C-helixem. Tyto intramolekulární interakce ve struktuře CaMKK2 jsou napříč různými živočišnými druhy velmi podobné [6].

Při základní koncentraci Ca^{2+} zůstávají CaM-kinasy v neaktivním stavu kvůli autoinhibičnímu mechanismu [2]. Obě isoformy CaMKK jsou autoinhibovány prostřednictvím úseku aminokyselin na jejich C-konci v místě 435-440, který interaguje s kinasovou doménou [14]. Tato interakce mezi kinasovou a autoinhibiční doménou zabraňuje navázání substrátu i ATP a kinas je tedy neaktivní. Tuto interakci oslabuje vazba $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplexu k $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -vazebné doméně [6]. V N-koncové doméně CaMKK je úsek 23 aminokyselin na pozici 129–151, který způsobuje potlačení autoinhibující interakce a tedy způsobuje $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -nezávislou aktivitu [6], [15]. Přestože fosforylace některých substrátů, jako například AMPK, není řízena $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplexem, ale závisí na autonomní aktivaci CaMKK2, je pro ni stále podmínkou vazba komplexu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ na CaMKK2 [16]. Vazba $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplexu uvolňuje autoinhibici a vede k plně aktivní kinase [10] (obrázek 4, vpravo). Pomocí hmotností spektroskopie byla ve struktuře CaMKK2 nalezena tři fosforylační místa, která jsou vysoce konzervovaná v myši, krysi a lidské isoformě. Jsou to místa Ser¹²⁹, Ser¹³³ a Ser¹³⁷ [15], [17]. Mutace těchto aminokyselinových zbytků způsobuje vzrůst autonomní aktivity, ale $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependentní aktivita se nemění. Tato mutace také snižuje stabilitu CaMKK2 [17] (obrázek 4, uprostřed). CaMKK2 autonomně aktivovaná defosforylací těchto tří serinových residuí a fosforylací Thr⁴⁸² má mnohem kratší poločas života a degraduje mnohem rychleji [10] (obrázek 4, vlevo).



Obrázek 4: Schematicky znázorněná aktivace CaMKK2. Vlevo zobrazená autonomní aktivita způsobená fosforylací Thr⁴⁸², uprostřed maximální aktivita způsobená mutací Ser¹²⁹, Ser¹³³ a Ser¹³⁷, vpravo aktivita závislá na vazbě Ca²⁺/CaM komplexu. Převzato z [10].

Způsob aktivace jednotlivých isoform CaMKK je odlišný. Zatímco aktivita CaMKK1 závisí výhradně na vazbě Ca²⁺/CaM komplexu, CaMKK2 vykazuje výraznou autonomní aktivitu nezávislou na Ca²⁺/CaM komplexu, která představuje cca 60–70 % celkové kinasové aktivity CaMKK2 [6]. Tyto regulační rozdíly umožňují poměrně malé rodině kinas kontrolovat velké množství buněčných funkcí a biologických procesů [2].

Překryv autoinhibiční a Ca²⁺/CaM-vazebné domény v CaMKK2 je podobný překryvům těchto domén vyskytujících se ve struktuře CaMKI a CaMKIV [13], ale po navázání Ca²⁺/CaM na Ca²⁺/CaM-vazebné místo je struktura CaMKK2 znatelně odlišná od struktur CaMKI a CaMKIV. Z této skutečnosti vyplývá, že vazba Ca²⁺/CaM na isoformy CaMKK způsobuje konformační změny struktury odlišné od změn takto způsobených ve struktuře isoform CaMK [6].

Fosforylace prostřednictvím proteinkinasy A (PKA) negativně ovlivňuje aktivitu obou isoform CaMKK [6] tak, že PKA fosforyluje Ser⁴⁵⁸, což zabraňuje vazbě Ca²⁺/CaM na Ca²⁺/CaM-vazebnou doménu [14].

1.1.2 CaMK Signální dráha

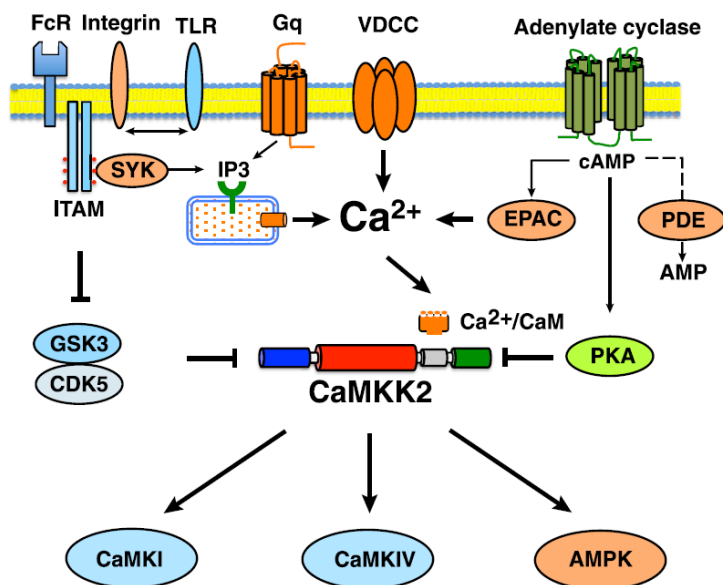
CaMK kaskáda byla poprvé objevena v roce 1994, kdy byl vypurifikován Ca²⁺/CaM-dependentní proteinový aktivátor kinas CaMKI a CaMKIV, dnes známý jako CaMKK, který je počátečním prvkem CaMK kaskády [18], [19].

Vápenatý kation Ca²⁺ je jednou z nejrozšířenějších částic uplatňujících se v buněčné signalizaci [2]. Tento kation funguje jako tzv. druhý posel, kdy se uvolňuje v reakci na vazbu ligandů (prvních poslů) na receptory [20]. Přestože je kation Ca²⁺ nezbytný pro mnoho buněčných dějů, je kvůli své vysoké reaktivitě při dlouhodobé vysoké koncentraci pro buňku toxický, proto buňky v bazálním stavu udržují tuto koncentraci velmi nízkou pomocí řady iontových pump, měničů a pufrů [2]. Na zvýšenou intracelulární koncentraci Ca²⁺ pak odpovídá svojí aktivací CaMK kaskáda [9].

Koncentrace Ca²⁺ v buňce vzrůstá několika možnostmi (obrázek 5 na straně 13). Prostřednictvím vápníkových kanálů závislých na napětí (VDCC, z *angl. voltage-dependent calcium channel*) umístěných v cytoplazmatické membráně mohou Ca²⁺ ionty vstupovat do buňky přímo skrz membránu [10]. Tento nárůst se napříč typy buněk a buněčných podjednotek velmi liší [2]. Vápenaté ionty se taktéž mohou uvolňovat z vnitrobuněčných zásobáren iontů. Jednou z takových zásobáren jsou inositol-trisfosfátové receptory (IP₃) [2]. Aktivovaný G_q-coupled receptor aktivuje IP₃ receptor a ten uvolňuje Ca²⁺ do buňky. IP₃ receptor může být aktivován také prostřednictvím propojení integrinového nebo jiného

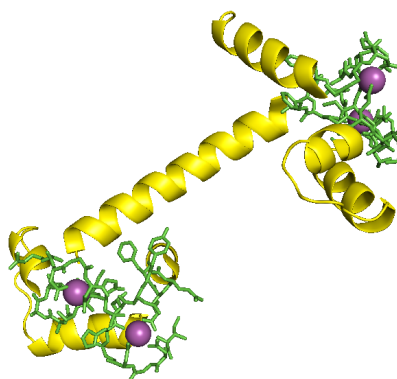
imunoreceptorového tyrosinového aktivačního motivu (ITAM, z *angl. immunoreceptor tyrosin-based activation motif*). Další možností jsou signály regulující vnitrobuněčnou koncentraci cAMP, které aktivují EPAC/PKA-dependentní dráhu a opět uvolňují Ca^{2+} [10].

Na rozdíl od Ca^{2+} /CaM-dependentní aktivity, autonomní aktivace CaMKK2 nezávisí na přítomnosti Ca^{2+} a je řízená cyclin-dependentní kinasou 5 (CDK5) a glykogensythasa kinasou 3 (GSK3), což jsou kinasy zodpovědné za fosforylaci serinových residuí inhibované CaMKK2, a tedy mohou řídit autonomní aktivaci prostřednictvím defosforylace těchto residuí [17].



Obrázek 5: Schéma možností ovlivnění koncentrace Ca^{2+} a následné aktivace CaMKK2 v buňce. Převzato z [10].

Kationty Ca^{2+} jsou vázány do komplexu kalmodulem. Kalmodulem (CaM) je protein, který se účastní kroku Ca^{2+} -signálních drah následujícího po zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , kdy se chová jako Ca^{2+} -receptor a vytváří Ca^{2+} /CaM komplex [2]. CaM má molekulovou hmotnost okolo 17 kDa a je vysoce konzervovaný napříč všemi organismy. Skládá se z C-koncového a N-koncového laloku, které umožňují vazbu celkem 4 iontů Ca^{2+} a jsou propojeny vysoce flexibilním helixovým regionem [21]. Tato struktura umožňuje kalmodulemu vytvoření různých konformací pro vazbu na různé cílové proteiny (obrázek 6 na straně 14). Kalmodulem samotný nemá žádnou enzymovou aktivitu a jeho funkcí je pouze přenést Ca^{2+} signál na další enzymy v CaMK kaskádě [22]. Vzhledem ke kinetice vytváření komplexu Ca^{2+} /CaM by byl kalmodulem velmi špatným běžným buněčným receptorem Ca^{2+} . I přes tuto relativně nízkou afinitu CaM k Ca^{2+} však slouží jako hlavní přenašeč vápníkového signálu, a to proto, že jeho afinita k vápenatému kationtu výrazně vzrůstá v přítomnosti cílového enzymu komplexu Ca^{2+} /CaM, kdy mezi Ca^{2+} , CaM a cílovým enzymem dochází k termodynamickému párování a tvorba Ca^{2+} /CaM komplexu se přizpůsobuje přítomnosti konkrétní cílové molekuly [2].



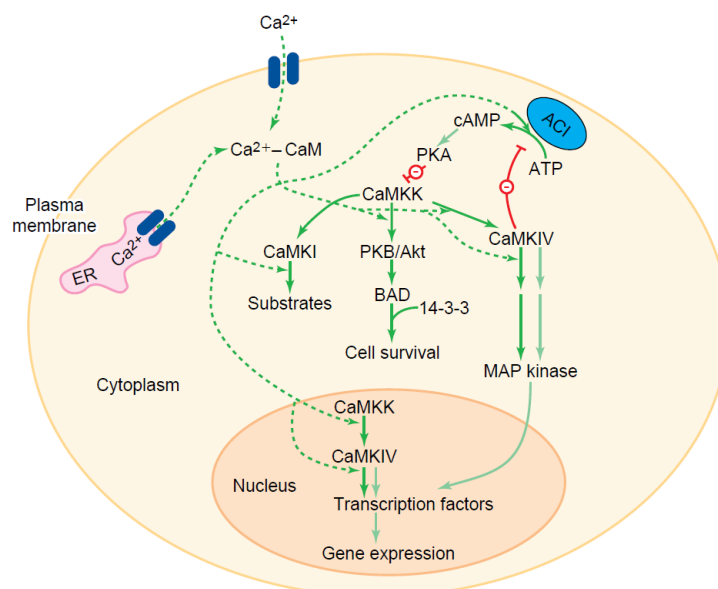
Obrázek 6: Krystalová struktura kalmodulinu. Zelenou barvou jsou zobrazena vazebná místa vápenatých iontů, fialovou barvou vápenaté ionty. Vizualizace vytvořena v programu PyMol za použití struktury převzaté z PDB databáze (PDB ID: 1CLM) [23].

Vazba $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplexu na CaMKK uvolňuje interakci mezi kinasovou a autoinhibiční doménou a způsobuje tak aktivaci CaMKK. Aktivovaná CaMKK má řadu substrátů, patří mezi ně CaMKI, CaMKIV, PKB a AMPK [6]. Fosforylace CaMKI a CaMKIV prostřednictvím CaMKK2 probíhá na threoninových residuích aktivační smyčky. Konkrétně to jsou Thr¹⁷⁷ pro CaMKI a Thr²⁰⁰ pro CaMKIV, jejichž mutace zabraňuje fosforylaci a tedy i aktivaci CaMKI a CaMKIV prostřednictvím CaMKK2 [24]. K fosforylaci a aktivaci AMPK dochází při zvýšení vnitrobuněčné koncentrace iontů Ca^{2+} v LKB1-deficitních buňkách [25].

Fosforylace PKB je významná pro ochranu buněk, před apoptózou [9], [1]. Aktivní PKB fosforyluje BAD, což je pro-apoptický člen Bcl-2 rodiny. Fosforylovaný BAD váže do komplexu 14-3-3 protein a tím zabraňuje apoptóze [9].

Pro aktivaci CaMKI a CaMKIV je nutná jednak fosforylace prostřednictvím aktivní CaMKK, a jednak i vazba $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ na $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -vazebnou doménu příslušné kinasy. Tato dvojitá regulace kinasové aktivity, vede k zesílení buněčné citlivosti na změny koncentrace Ca^{2+} a CaMK kaskáda je tak schopná reagovat i na relativně malé změny této koncentrace [14].

CaMKIV je třetí enzym v CaMK kaskádě, který má dvě isoformy, α a β . Obě tyto isoformy vznikají jako monomer o hmotnosti zhruba 65 kDa. CaMKIV α se nalézá zejména v neuronové tkáni, T-buňkách a varlatech. CaMKIV β exprimuje v granulárních buňkách mozečku [26], [27]. Při aktivaci CaMKIV se nejdříve váže $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a poté CaMKK fosforyluje kinasu v aktivační smyčce na Thr¹⁹⁶. Po fosforylaci prostřednictvím CaMKK může nastat autofosforylace Ser/Thr-bohatého N-konce, což generuje $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -nezávislou aktivitu CaMKIV [28]. V cytosolu dochází k fosforylaci a deaktivaci adenylátcyclasy I (ACI) vlivem aktivované CaMKIV, čímž dochází ke snížení koncentrace cAMP, což způsobuje aktivaci PKA, která fosforyluje a tím deaktivuje CaMKK. V cytosolu taktéž dochází k aktivaci MAP kinas prostřednictvím CaMKIV, které se přesouvají do jádra, kde fosforylují transkripční faktory [9]. V jádře CaMKIV reguluje Ca^{2+} -dependentní genovou transkripci fosforylací několika transkripčních faktorů, např. CREB (cAMP response element binding protein), SRF (serum response factor) a HDAC4 (histone deacetylase 4) [29], [30], [31]. Iniclace genové transkripce CaMKIV je závislá na její autonomní Ca^{2+} nezávislé aktivitě, přestože k její indukci je třeba aktivace prostřednictvím $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a CaMKK [32].



Obrázek 7: Schéma CaMK kaskády. Tmavě zelené šipky znázorňují děje přímo regulované $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, světle zelené šipky znázorňují děje nezávislé na $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a červené čáry představují inhibiční mechanismy. Převzato z [9]

Dalším členem CaMK kaskády je CaMKI, což je monomerická kinasa exprimována ve třech isoformách, α , β a γ , v různých typech buněk savců, kde v cytosolu slouží k řadě funkcí [33]. Nejlépe charakterizovanými substráty CaMKI jsou synapsin 1, který váže vezikuly obsahující neurotransmitery k presynaptickému cytoskeletonu, a CREB, který reguluje genovou transkripci [2].

1.1.3 Biologická role CaMKK2 v živých organismech

CaMKK se nachází v cytosolu a jádře, kde odpovídá na cytosolickou nebo jadernou změnu koncentrace Ca^{2+} [8]. K expresi CaMKK2 dochází zejména v některých částech mozku. Konkrétně to jsou hippocampus, hypotalamus, amygdala, čichový bulbus a mozeček. Kromě mozku a tedy celého nervového systému se CaMKK2 nachází i ve varlatech, slezině a plicích. Přítomnost CaMKK2 byla ověřena také v izolovaných myších preadipocytech, hepatocytech a zárodečných fibroblastech, a taktéž v lidských endotelových buňkách žil pupeční šňůry a v buňkách kostní dřeně [24].

Funkce CaMKK2 v mozku

Vápník řídí mnoho neuronových funkcí, například syntézu a vylučování neurotransmiterů a morfologii dendritických trnů [34] a proteiny účastnící se vápníkem řízených signálních drah jsou tedy velmi důležité pro fyziologii mozku a vývoj neuronů. Nedostatek enzymu CaMKK2 prokázal špatný vývoj dlouhodobé paměti [35], [36] a selektivní ztrátu potenciace synapsí CA1 části hippocampu [35]. Pyramidální neurony v CA1 části hippocampu disponují schopností tzv. synaptické plasticity [37], což znamená, že se synapse mezi těmito neurony zesiluje nebo zeslabuje v závislosti na jejich aktivitě [38]. Změny morfologie dendritických trnů jsou podmínkou pro iniciaci a udržení této synaptické plasticity a tvoří tak strukturní základ pro utváření paměti [37]. Kvůli změnám ve fosforylaci významných serinových residuí CaMKK2 je ovlivněna schopnost CaMKK2 řídit utváření neuronů, z čehož vyplývá, že se CaMKK2/CaMKI signální dráha významně podílí na přestavbě neuronové vláknité sítě, ke které dochází vlivem učení [17], [39].

Jednou z funkcí hypotalamu je řízení hormonálních a nutričních signálů pro řízení přijímání potravy, výdeje energie a metabolismu glukosy [40]. Součástí exprese ghrelinu, což je hormon, který se vytváří v hypotalamu a řídí apetit vazbou na sekreční receptor růstového hormonu a zvyšuje vnitrobuněčnou koncentraci Ca^{2+} , je AMPK, jeden ze substrátů CaMKK2 [41]. CaMKK2 se nachází ve střední části hypotalamu, zejména ve ventromediálním jádře [42]. Genetický nedostatek CaMKK2 způsobuje snížení hypotalamické aktivity AMPK a tedy exprese ghrelinu. Studie na myších prokázaly, že nedostatek CaMKK2 způsobuje ochranu vůči obezitě způsobené přijímáním velkého množství tuku, hyperglykémii a rezistenci na inzulin [19].

Funkce CaMKK2 při adipogenezi

CaMKK2/AMPK kaskáda má efekt v signální dráze vývoje tukových buněk, tedy při adipogenezi. Adipogeneze je proces, při kterém se z mezenchymálních kmenových buněk oddělují adipocyty neboli tukové buňky. Tento proces začíná v pozdní fázi těhotenství a je regulován dostupností živin. CaMKK2 exprimuje v preadipocytech, přesto se nenachází v bílé tukové tkáni dospělého organismu ani v izolovaných adipocytech. Bílá tuková tkáň (WAT, z *angl. white adipose tissue*) slouží zejména k regulaci energetické homeostáze organismu. Nedostatek CaMKK2 vede k nárůstu hmotnosti WAT a ke snížení množství preadipocytů v této tkáni. Potlačení projevů aktivity AMPK α má při adipogenezi srovnatelný efekt jako genetická ablace CaMKK2 [43].

Funkce CaMKK2 v krvetvorbě

Substráty CaMKK2 řídí důležité kroky tvorby krve a imunitních buněk, např. CaMKIV řídí životnost aktivovaných dendritických buněk a reakci protilátek na vakcinaci, CaMKI se účastní zánětlivé odpovědi na sepsi a AMPK, se také uplatňuje ve tvorbě zánětů. CaMKK2 se tedy uplatňuje v řízení tvorby krevních buněk a zánětů a také se uplatňuje v tvorbě bílých krvinek a aktivaci makrofágů [10]. Hematopoetické kmenové buňky (HSCs, z *angl. hematopoietic stem cells*) se samoobnovují nebo dělí do unipotentních kmenových buněk (progenitorů), ze kterých se následně tvoří všechny zralé krevní buňky [44]. Bylo prokázáno, že ztráta CaMKK2 vede k nižšímu počtu HSCs a obecně buněk kostní dřeně, nicméně vyčerpání CaMKK2 neovlivňuje množení, přežití ani funkci HSCs, na rozdíl od nedostatku CaMKIV. Růst a množení CaMKK2 $^{-/-}$ HSCs vyvolaný transplantací kostní dřeně vede ke zvýšené tvorbě myleoidních buněk a ke zvýšené schopnosti CaMKK2-deficitních myleoidních progenitorů vyvíjet se v CFU-granulocyty (z *angl. colony forming unit granulocytes*) [45].

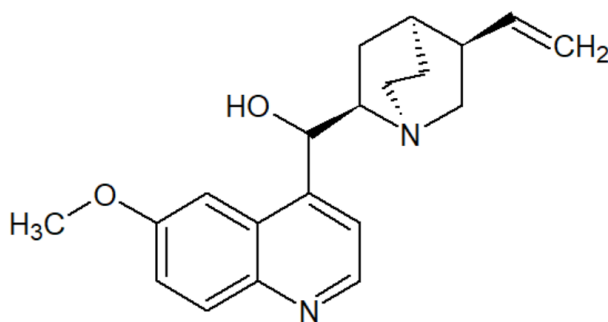
1.2 Fluorescence

Luminiscence je emise světla jakékoliv látky v elektronově excitovaném stavu. Luminiscence se dělí na dva typy podle typu excitovaného stavu látky, fluorescenci a fosforescenci [46].

Při singletovém excitovaném stavu je elektron v excitovaném orbitalu párovaný s elektronem v základním stavu a návrat z excitovaného do základního stavu není doprovázen změnou spinu, je spinově povolený a nastává rychle za emise protonu. To se nazývá fluorescence, jejíž emisní intenzita se typicky pohybuje kolem 10^{-8} s^{-1} , takže doba života fluoroforu, což je průměrný čas mezi excitací a návratem do základního stavu, je blízká 10 ns. Fluorescence je významnou metodou používanou např. v biotechnologii, DNA sekvenování, forenzní a genetické analýze a mnoha dalších odvětvích. Detekce fluorescence je velmi citlivá a tak lze díky ní odhalit lokalizaci a množství vnitrobuněčných molekul, někdy i na úrovni detekce jednotlivých molekul [46].

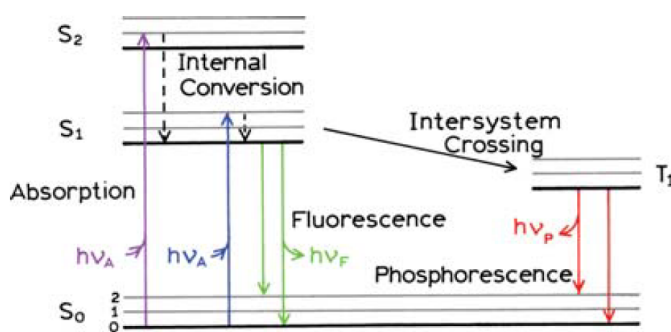
Fosforescence je emise z tripletového excitovaného stavu, kdy má excitovaný elektron stejný spin jako elektron v základním stavu a přechod do základního stavu je tedy spinově zakázaný. Oproti fluorescenci je tak fosforescence velmi pomalá, její doba života se pohybuje v řádu milisekund až sekund, ale i déle, exponovaná látka může svítit i několik minut. Typickým příkladem jsou mnohé hračky svítící ve tmě [46].

K fluorescenci typicky dochází u aromatických molekul, nejstarším a nejznámějším příkladem je chinin, který je obsažený např. v nápoji tonic (obrázek 8). K objevu fluorescence došlo právě na chininu, kdy v roce 1845 Sir John Frederic William Herschel pozoroval záření roztoku chininu vystaveného slunci. V 50. letech 20. století došlo k velkému vývoji spektrofluorimetrů, který započal během 2. světové války kvůli výzkumu antimalarických léků [46].



Obrázek 8: Vlevo struktura chininu vytvořená v programu ChemSketch. Vpravo ukázka fluorescence lahve nápoje tonic, který obsahuje chinin. Převzato z [47].

Děje mezi absorpcí a emisí světla molekulou se zobrazují Jablonského diagramem (obrázek 9). Tyto diagramy jsou pojmenované po profesoru Alexandru Jablonském, který je považován za zakladatele fluorescenční spektroskopie [46].



Obrázek 9: Jablonského diagram. Převzato z [46].

Ve schématu Jablonského diagramu jsou vidět 3 energetické elektronové stavy. Základní stav je označen jako S_0 , první a druhý excitovaný stav je označen jako S_1 a S_2 . Každý tento stav obsahuje několik vibračních energetických hladin označených jako 0, 1 a 2. Ve znázorněném Jablonského diagramu nejsou zobrazeny interakce jako zhášení, interakce fluoroforu s rozpouštědlem, přenos energie apod [46]. Přechody mezi jednotlivými stavy, které jsou v diagramu znázorňovány jako svislé čáry, trvají kolem 10^{-15} s, což je čas příliš krátký pro přechod jádra, proto jsou všechny elektronové přechody vertikální a nemění se při nich pozice jádra. Tento děj je označován jako Franck-Condonův princip [48]. Energetický rozdíl mezi S_0 a S_1 stavem je příliš velký pro tepelnou populaci S_1 stavu, proto se pro indukci fluorescence používá světlo a ne teplo. Absorpce a emise nastává většinou u molekul s nejnižší vibrační energií, nicméně fluorofor je většinou excitovaný na vyšší vibrační hladinu excitovaného energetického stavu. Molekuly v kondenzovaných fázích rychle podléhají vnitřní konverzi trvající zhruba 10^{-12} s nebo méně, tj. relaxují na nejnižší vibrační hladinu S_1 stavu. Vnitřní konverze je kompletní před emisí, jelikož běžná délka existence fluorescence je cca 10^{-8} s. Emise se objevuje z tepelně vyvážených excitovaných stavů, tedy z nejnižší vibrační hladiny S_1 stavu, a návrat do základního stavu bývá do vyšší vibrační hladiny základního stavu, který pak rychle dosáhne tepelné rovnováhy. Tato emise do vyšší vibrační hladiny způsobuje, že emisní spektrum je často zrcadlovým obrazem absorpčního spektra $S_0 \rightarrow S_1$ přechodu. Molekuly v S_1 stavu také mohou podstoupit spinovou konverzi do prvního tripletového stavu T_1 a emitovat fosforescenční záření. Tato konverze se nazývá přeshraniční přechod (intersystem crossing). Tento přechod podstupují zejména molekuly obsahující těžké atomy jako např. I nebo Br [46].

Z Jablonského diagramu je patrné, že energie emise je typicky menší než energie absorbovaná a fluorescence tak nastává s nižší energií nebo vyšší vlnovou délkou. Tento děj byl objeven Sirem G. G. Stokesem v roce 1852, a nazývá se Stokesův posun. Stokesův posun je pozorován pro všechny fluorofory v roztoku a nejvýraznější je pro polární látky v polárním rozpouštědle kvůli interakcím mezi fluoroforem a jeho nejbližším okolím. Stokesův posun způsobuje právě rychlý pád na nejnižší vibrační hladinu stavu S_1 , kdy je přebytek energie rychle rozptýlen jako důsledek silného překryvu mezi mnoha stavy o podobné energii. Kvůli této relaxaci jsou emisní spektra obvykle pozorována stejná nezávisle na excitační vlnové délce, což je známo jako Kashaovo pravidlo. Pokud je fluorofor excitován do vyššího elektronového stavu než je S_1 , není jeho emisní spektrum přesným zrcadlovým obrazem jeho celkového absorpčního spektra, jelikož je odrazem spektra přechodu $S_0 \rightarrow S_1$ [46].

Výjimka z pravidla zrcadlové podobnosti nastává u fluoroforů citlivých na pH, kdy při změně pH může docházet k protonaci nebo deprotonaci funkční skupiny a tím se mění vibrační struktura molekuly [46].

Nejdůležitější charakteristiky fluoroforu jsou doba života fluorescence a kvantový výtěžek. Kvantový výtěžek je počet emitovaných fotonů vůči počtu absorbovaných, proto látky s větším kvantovým výtěžkem poskytují silnější emisi. Kvantový výtěžek je definován rovnicí (1), kde Γ je emisní intenzita fluorescence a k_{nr} je intenzita nezářivého přechodu

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1)$$

Kvantový výtěžek se může blížit jedné v případě, že je nezářivý přechod mnohem méně významný než zářivý, tedy když $k_{nr} \ll \Gamma$ [46].

Doba života určuje čas, po který může fluorofor reagovat, a je definována jako průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do základního. Doba života fluorescence je definována rovnicí (2).

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2)$$

Fluorescenční emise je náhodný proces a jen málo molekul emituje fotony přesně dobu odpovídající době života, ta je pouze průměr časových hodnot. Doba života fluoroforu při absenci nezářivého přechodu se nazývá přirozená doba života τ_n . Těžké atomy, jako například jod, typicky vedou ke kratší době života a nižšímu kvantovému výtěžku [46].

Fluorofory se dělí na vnitřní a vnější, přičemž vnitřní fluorofory existují přirozeně, zatímco vnější jsou ty, které iniciují fluorescenci vzorku, jež sám o sobě neemituje [46].

1.2.1 Fluorescence biomolekul

Proteiny jsou mezi biomolekulami jedinečné v emitování fluorescenčního záření. Lipidy, sacharidy a membrány jsou typicky nefluorescentní a fluorescence DNA je zanedbatelná. Proteiny obsahují celkem tři aminokyseliny, které přispívají k proteinové fluorescenci. Jsou to tyrosin (Tyr, Y), tryptofan (Trp, W) a fenylalanin (Phe, F). Tyto tři fluorescentní aminokyseliny – fenylalanin, tyrosin a tryptofan – jsou aromatické a v proteinech relativně vzácné [49].

Nejvýznamnějším fluoroforem proteinů je indolová skupina tryptofanu, který je v proteinech přítomný pouze v cca 1 % mol, což je pravděpodobně následek velké metabolické náročnosti jeho syntézy [49]. Energie absorbovaná fenylalaninem a tyrosinem často přechází na tryptofan [49]. Indol absorbuje při 280 nm a emituje blízko 340 nm a jeho emisní spektrum je vysoce citlivé na polaritu rozpouštědla. Emise indolu může být posunuta ke kratším vlnovým délkám tzv. modrým posunem, pokud je indolová skupina pohřbená v nativním proteinu. Naopak červený posun k delším vlnovým délkám nastává, když je protein rozbalený. Na základě emisních spekter indolu lze určit pozici tryptofanového zbytku v proteinu [46].

Proteiny jsou obecně excitovány zářením o vlnové délce 280 nm. Při této vlnové délce fenylalanin v podstatě neemituje fluorescenční záření, jeho kvantový výtěžek je blízký 0,03. Absorpce při 280 nm je tak způsobena převážně tyrosinovými a tryptofanovými zbytky. Posunutím excitační vlnové délce k 295 nm pak lze získat absorpci tryptofanu neovlivněnou tyrosinovými zbytky [49]. Tryptofanová emisní maxima a kvantové výtěžky se v různých proteinech liší, jsou však velmi podobné pro denaturované a rozbalené proteiny [49].

Proteinová fluorescence je významná pro studium vazebných interakcí proteinů, kdy se využívá vysoká citlivost fluorescence a schopnost měřit zředěné proteinové roztoky. Jedním z příkladů je studium interakce proteinu s kalmodulinem. Protože kalmodulin neobsahuje žádný tryptofan, neovlivňuje fluorescenci sledovaného proteinu svým přispěvkem. Předpokládá se, že kalmodulin neinteraguje s proteinem před navázáním Ca^{2+} , nicméně dřívější spojení proteinu s kalmodulinem zvyšuje rychlost reakce na přídavek Ca^{2+} [46].

1.2.2 Zhášení fluorescence

Intenzita fluorescenčního záření může být snížena řadou dějů. Zhášení fluorescence je proces, při kterém dochází ke snižování intenzity fluorescenčního záření, nejčastěji vlivem deaktivace excitovaného stavu fluoroforu kontaktem s jinou molekulou, která se nazývá zhášedlo. Jako zhášedlo se může chovat mnoho molekul, např. kyslík, halogeny, aminy nebo elektron-deficitní molekuly jako je akrylamid. Akrylamid a jodid jsou polární molekuly, a tedy nepronikají snadno do nepolárních proteinových oblastí. Naopak malá nepolární molekula kyslíku se snadno dostává do všech oblastí proteinu. A proto je kyslík účinnější zhášedlo než akrylamid a jodid [50].

Zhášení a pokles intenzity je popsáno Stern-Volmerovou rovnicí (3)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{SV}} \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q], \quad (3)$$

kde K_{SV} je Stern-Volmerova zhášecí konstanta, k_q je bimolekulární zhášecí konstanta, τ_0 je doba života nezhášené fluorescence a $[Q]$ je koncentrace zhášedla. Stern-Volmerova konstanta vyjadřuje, jak velký efekt má zhášedlo na fluorofor, obvykle je tedy K_{SV} nízká pro fluorofory pohřbené v makromolekule, naopak vyšších hodnot nabývá pro fluorofory v roztoku nebo na povrchu biomolekuly [50].

Pro různé dvojice fluorofor-zhášedlo existují různé mechanismy zhášení, například zhášení indolu akrylamidem pravděpodobně způsobuje přenos elektronu z excitovaného indolu na akrylamid. Dále například mohou zhášedlo a fluorofor vytvářet nezářivý komplex a tedy způsobovat statické zhášení. Zhášení také může být důsledkem nemolekulárních mechanismů jako například útlumu záření fluoroforem samotným nebo jinými absorbujícími součástmi. Při zhášení však nenastává žádná trvalá změna molekul [50].

Pro statické zhášení je intenzita fluorescence závislá na koncentraci zhášedla a tato závislost je odvozená od asociační konstanty vytváření komplexu, která je daná jako

$$K_{\text{S}} = \frac{[F - Q]}{[F] \cdot [Q]}, \quad (4)$$

kde $[F - Q]$ je koncentrace komplexu, $[F]$ je koncentrace nekomplexovaného fluoroforu a $[Q]$ je koncentrace zhášedla. Celková koncentrace fluoroforu $[F_0]$ je

$$[F_0] = [F] + [F - Q] \quad (5)$$

Dosazením rovnice (5) do rovnice (4) a substitucí koncentrace fluoroforu intenzitou fluorescence dává rovnici

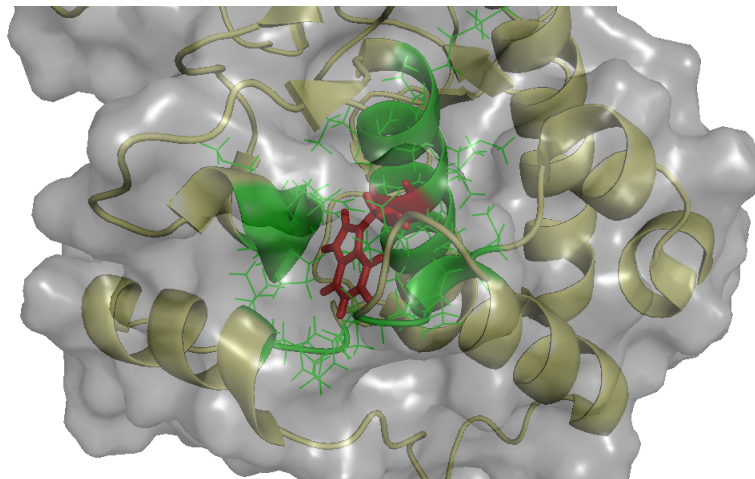
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{S}}[Q], \quad (6)$$

což je závislost totožná se Stern-Volmerovou rovnicí [50].

Pro nalezení fluoroforu v makromolekule nebo k určení poréznosti proteinů a membrán vůči zhášedlům lze využít rozdíly v přístupnosti fluoroforu zhášedlu. Tryptofan na povrchu molekuly nebo membrány bude zhášen, pro tryptofan pohřbený v proteinu není žádné zhášení očekáváno, jelikož ve vodě rozpustná zhášedla se nedostávají do hydrofobních oblastí proteinu. Emisní intenzita tryptofanu na povrchu proteinu nebo membrány však může být snížena interakcí se zhášedlem rozpustným ve vodě [49].

Rozdílně přístupné tryptofanové zbytky v proteinech jsou často rozlišovány právě za pomoci zhášení. Fluorescence může být zhášena přidaným zhášedlem nebo okolními postranními řetězci v proteinu. Vysoce proměnlivé kvantové výtěžky tryptofanu jsou způsobené blízkými zhášedly v proteinu, jimiž jsou postranní řetězce lysinu a histidinu. Také amidová skupina peptidové páteře může působit jako zhášedlo [49].

Pomocí mutagenese zaměřené na přesné místo v proteinu lze vytvářet mutanty proteinů s pouze jedním tryptofanovým zbytkem, vložit tryptofan na určité místo v proteinu nebo modifikovat prostředí v okolí tryptofanu [49]. Takové mutagenese bylo využito pro stanovení přístupnosti tryptofanu na pozici 374 v CaMKK2, kdy byl druhý tryptofan nacházející se v nativní struktuře proteinu na pozici 445 nahrazen fenylalaninem. Na základě krystalové struktury CaMKK2 v okolí sledovaného tryptofanu na pozici 374 (obrázek 10 na straně 21) lze říci, že tento tryptofan je v nativní struktuře proteinu tzv. pohřbený a tedy není dobře přístupný zhášedlu. Proto byla získaná data vyhodnocována pomocí modifikované Stern-Volmerovy rovnice (10) [50].



Obrázek 10: Detail okolí sledovaného Trp³⁷⁴. Příslušný tryptofan je znázorněn červeně, jeho okolí ve vzdálenosti 5 Å je znázorněno zeleně. Obrázek vytvořen v programu PyMol s využitím struktury z PDB (PDB ID: 5UY6) [7].

Modifikovaná Stern-Volmerova rovnice zohledňuje dvě formy fluoroforu – přístupnou a nepřístupnou zhášedlu. Pro celkovou fluorescence F_0 v nepřítomnosti zhášedla pak platí rovnice

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b}, \quad (7)$$

kde F_{0a} je fluorescence přístupné frakce a F_{0b} je fluorescence nepřístupné frakce. V přítomnosti zhášedla intenzita fluorescence přístupné frakce klesá podle Stern-Volmerovy rovnice a výsledná intenzita je tedy dána rovnicí

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a \cdot [Q]} + F_{0b}, \quad (8)$$

kde K_a je Stern-Volmerova zhášecí konstanta přístupné frakce a $[Q]$ je koncentrace zhášedla. Substitucí rovnice 8 do rovnice 7 získáváme rovnici pro pozorovanou intenzitu

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \cdot \left(\frac{K_a \cdot [Q]}{1 + K_a \cdot [Q]} \right). \quad (9)$$

Převrácením rovnice 9 a jejím vydělením rovnice 7 získáváme výslednou závislost

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a \cdot K_a \cdot [Q]} + \frac{1}{f_a}, \quad (10)$$

kde f_a je zlomek fluoroforu přístupný zhášedlu. Pro přístupný fluorofor je očekáváno kompletní zhášení, takže posun na ose y je 1. Pokud je část fluoroforu nepřístupná, je ΔF menší než F_0 a posun na ose y je větší než 1 [50].

2 Cíl práce

- Expres a purifikace lidské CaMKK2 s mutací W445F (CaMKK2 W374) (sekvence 93-517).
- Expres a purifikace kalmodulinu (CaM).
- Expres a purifikace TEV proteasy.
- Posouzení vlivu vazby kalmodulinu na přístupnost Trp³⁷⁴ CaMKK2 W374 pomocí metody dynamického zhášení fluorescence.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

1,4-dithiothreitol	Sigma-Aldrich
akrylamid	Carl Roth
akrylamid/bisakrylamid	Carl Roth
ampicilin	Carl Roth
azid sodný	Penta
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R-250	Carl Roth
dihydrogenfosforečnan draselný	Penta
dodecylsírán sodný, SDS	Carl Roth
fenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF	Carl Roth
glukosa	Carl Roth
glycerol	Carl Roth
glycin	Carl Roth
hydrogenfosforečnan sodný	Penta
chloramfenikol	Carl Roth
chlorid draselný	Carl Roth
chlorid sodný	Carl Roth
chlorid vápenatý	Lach:Ner
imidazol	Carl Roth
isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid, IPTG	Carl Roth
kanamycin	Carl Roth
kvasinkový extrakt	Carl Roth
kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA	Carl Roth
kyselina octová	Penta
lysosym	Carl Roth
médium Luria-Bertani, LB	Carl Roth
methanol	Penta
persulfát amonný, APS	Sigma-Aldrich
sírán amonný	LACHEMA
sírán hořečnatý	Penta
sírán nikelnatý	Penta
tetramethylethyldiamin, TEMED	Carl Roth
tris	Carl Roth
tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid, TCEP	Carl Roth
trypton	Carl Roth
α -lactosa	Carl Roth
β -merkapt ethanol	Carl Roth

3.1.2 Přístroje

Centrifuga 5804R	Eppendorf
Centrifuga MPW-352R	Unimed
Centrifuga Z323K	Hermle
HPLC	Watrex

Magnetická míchačka Variomag	P-Lab
NanoPhotometer P-Class P 300	IMPLEN
Peristaltická pumpa	IDEX
pH metr 3505 Jenway	P-Lab
Souprava na elektroforézu	Bio-Rad
Sonikátor Q700	QSonica
Spektrofluorimetr PC1	ISS

3.1.3 Ostatní materiál

Dialyzační membrána	Carl Roth
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
Kolona HiLoad Superdex 75 26/600	GE Healthcare
Koncentrátor Amicon Ultra MWCO 10000	Millipore
Koncentrátor Vivaspin Turbo MWCO 5000	Sartorius
Křemenná kyveta	Agilent
Laboratorní sklo	Simax
Mikrostríkačka HAMILTON	Hamilton
Mikrozkumavky	Eppendorf
Nylonové filtry	Whatman
Pipety	Eppendorf
Protein Blue Ladder	Biorad
Software Vinci	ISS
Špičky	Axygen

3.2 Exprese CaMKK2 W445F mutantu (CaMKK2 W374)

Byly připraveny 4 miniprepy obsahující 5 ml sterilního Luria-Bertani (LB) média s kanamycinem o koncentraci $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Do každého z nich byla přidána bakteriální kultura *E. Coli* BL21(DE3) obsahující plazmid pRSFDuet-1 ze zaklonovaným genem pro CaMKK2 W445F mutant (sekvence 93-517), dále označovaný jako CaMKK2 W374 (Trp³⁷⁴ je jediný tryptofanový zbytek, který se po mutaci W445F nachází v molekule CaMKK2). Tyto miniprepy byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C za konstantního třepání o rychlosti 200 rpm.

Další den bylo připraveno 8x900 ml Auto-indukčního média ZYP 5052 (složení viz tabulka 1) obsahujícího kanamycin o koncentraci $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Každý miniprep s narostlou kulturou byl rozdělen do dvou lahví Auto-indukčního média. Buněčné kultury byly dále inkubovány při teplotě 37°C za konstantního třepání o rychlosti 190 rpm až do optické hustoty $\text{OD}_{600} = 0,6$, kdy byla teplota snížena na 20°C a kultury byly inkubovány dalších 14 h.

Poté byly kultury centrifugovány při teplotě 4°C rychlostí 3400 rpm po dobu 20 min. Pelety byly následně resuspendovány ve 400 ml lyzačního pufru (složení viz tabulka 2) a zamrazen na teplotu 4°C .

Látka	Výsledná koncentrace
Trypton	1 %
Kvasinkový extrakt	0,5 %
Na_2HPO_4	$50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
KH_2PO_4	$50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
glycerol	0,5 %
glukosa	0,05 %
α -laktosa	0,2 %
MgSO_4	$2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Doplněno deionizovanou vodou na 900 ml.

Tabulka 1: Složení Auto-indukčního média pro expresi CaMKK2 W374 mutantu

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
10× PBS	1×	40 ml
NaCl	$1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	23,4 g
imidazol	$2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,0544 g
lysozym		0,04 g
β ME	$4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	111,2 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 400 ml.

Tabulka 2: Složení lyzačního pufru pro purifikaci mutantu CaMKK2 W374

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
NaCl	$1,37 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	80 g
KCl	$27 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2 g
KH_2PO_4	$18 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2,4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	14,4 g
NaN_3	$6 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,4 g

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l a pH upraveno na hodnotu 7,4.

Tabulka 3: Složení 10× koncentrovaného fosfátového pufru PBS použitého pro přípravu pufrů.

3.2.1 Sonikace

Další den byla suspenze bakterií rozmrazena a poté byl přidán 1 ml 0,1M roztoku PMSF. Pomocí sonikátoru byla působením ultrazvuku narušena buněčná stěna bakterií. Buňky byly ultrazvuku vystaveny celkem 8 min, vždy 3 s ON a 17 s OFF. Sonikát byl následně centrifugován při rychlosti 13500 rpm při teplotě 4 °C po dobu 40 min.

3.3 Purifikace CaMKK2 W374

3.3.1 Niklová chelatační chromatografie

Proteiny obsahující tzv. His-tag, tedy motiv šesti histidinů, je možné purifikovat pomocí niklové chelatační chromatografie, kdy se Ni^{2+} ionty nejprve zachytí na nosiči kolony a poté se protein prostřednictvím histidinového motivu koordinačně naváže na tyto Ni^{2+} ionty.

Kolona obsahující 5 ml Chelating Sepharose Fast Flow byla postupně promyta 15 ml deionizované vody, 25 ml 0,1M roztoku NiSO_4 , 15 ml vody a 10 ml pufru E (složení viz tabulka 4). Následně byla sepharosa přenesena do kádinky k sonikátu a ten byl za stálého míchání adsorbován po dobu 15 min při teplotě 4 °C. Po přenesení sepharosy s adsorbovaným proteinem zpět na kolony byla sepharosa promyta celkem 350 ml 10% pufru F, který byl připraven naředěním 35 ml pufru F (složení viz tabulka 5) pufr E do celkového objemu 350 ml. Protein byl eluován gravitačně 10 ml pufru F do 10 ml dialyzačního pufru (složení viz tabulka 6).

Kolona byla poté regenerována promytím 30 ml regeneračního roztoku Stripp (složení viz tabulka 7), 15 ml destilované vody a 20 ml 20% EtOH, ve kterém byla kolona zakonzervována a uchována v lednici k dalšímu použití.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
10× PBS	1×	100 ml
NaCl	$500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	29,2 g
imidazol	$1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,07 g
βME	$2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	139 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l.

Tabulka 4: Složení pufru E použitého při purifikaci mutantu CaMKK2 W374.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
10× PBS	1×	100 ml
NaCl	500 mmol · dm ⁻³	29,2 g
imidazol	400 mmol · dm ⁻³	27,2 g
βME	2 mmol · dm ⁻³	139 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l a pH upraveno na hodnotu 8.

Tabulka 5: Složení pufru F použitého při purifikaci mutantu CaMKK2 W374.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH=7,5)	50 mmol · dm ⁻³	50 ml
NaCl	500 mmol · dm ⁻³	29,3 g
βME	4 mmol · dm ⁻³	280 μl
glycerol	10 %	100 g
0,5M EDTA	5 mmol · dm ⁻³	10 ml

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l

Tabulka 6: Složení dialyzačního pufru použitého při purifikaci mutantu CaMKK2 W374.

Látka	Výsledná koncentrace
EDTA	100 mmol · dm ⁻³
NaCl	500 mmol · dm ⁻³

Tabulka 7: Složení roztoku Stripp pro regeneraci kolony pro niklovou chelatační chromatografii.

3.3.2 Dialýza

Pomocí dialýzy lze od sebe oddělit látky s různou velikostí molekul. Pro toto oddělení se používají komerčně dostupné polopropustné membrány, jejichž póry musí být větší než je velikost molekul dialyzovaného proteinu. Částice menší než póry membrány pak difundují ve směru koncentračního gradientu přes membránu a po dialýze se protein tedy nachází v dialyzačním pufru.

Pro dialýzu byla použita membrána o MWCO 14 kDa (*z angl. molecular weight cut-off*), což označuje velikost pórů přibližně odpovídajících velikosti proteinu o molekulové hmotnosti 14 kDa. Nejprve byl připraven 1 l dialyzačního pufru (složení viz tabulka 6), který byl vychlazen na teplotu 4 °C. Protein eluovaný při niklové chelatační chromatografii byl pipetou převeden do dialyzační membrány uzavřené svorkami a byl ponechán přes noc za stálého míchání při teplotě 4 °C.

3.3.3 Měření koncentrace proteinu

Před štěpením CaMKK2 W374 TEV proteasou bylo nutné určit proteinovou koncentraci a celkovou hmotnost proteinu. Pro toto určení byl použit přístroj NanoPhotometer IMPLN, který měří absorbanci roztoku při vlnové délce 280 nm a následně z Lambert-Beerova zákona a extinkčního koeficientu proteinu spočítá proteinovou koncentraci roztoku v mg/ml. Jako referentní vzorek pro měření absorbance byl použit čistý dialyzační pufr (složení viz tabulka 6).

3.3.4 Štěpení TEV proteasou

TEV proteasa je schopná odštěpit od proteinu His-tag, tedy histidinový motiv sloužící k zachycení na koloně při niklové chelatační chromatografii (kapitola 3.3.1 na straně 27). Pro štěpení 1 mg proteinu je potřeba 250 U TEV proteasy, přičemž 1 U = 0,125 μ l. Při první purifikaci bylo k 9,2 mg CaMKK2 W374 přidáno 284,5 μ l vypurifikované TEV proteasy. Při druhé purifikaci bylo k 27,8 mg proteinu přidáno 869,1 μ l TEV proteasy. Protein s TEV proteasou byl následně inkubován při teplotě 30 °C po dobu 1 hod.

3.3.5 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je separační metoda, při které se látky rozdělují podle velikosti molekul. Kolona pro gelovou permeační chromatografii je naplněna zrnitým porézním gelem, který tvoří stacionární fázi. Mobilní fázi tvoří pufr, který nese vzorek skrz kolonu, kterou různě velké látky prostupují různě rychle. Molekuly se rozdělují mezi pufr uvnitř a vně částic gelu, tedy malé molekuly se zdržují uvnitř pórů, zatímco molekuly větší než póry gelu procházejí kolonou bez zadržení a jsou tedy eluovány jako první.

Před nanesením proteinu na kolonu gelové permeační chromatografie je nutné protein zakonzentrovat na 2 ml a přefiltrovat. Protein byl koncentrován v koncentrátoru Amicon Ultra MWCO 10kDa v centrifuze 5804 R při rychlosti 2300 rpm na konečný objem 1,5 ml. Poté byl protein přefiltrován přes 0,45 μ M filtr.

Kolona HiLoad Superdex 75 (26/600) byla promyta přefiltrovaným pufr pro gelovou permeační chromatografii (složení viz tabulka 8) a protein byl nanesen na kolonu. Kolona byla promývána pufr pro gelovou permeační chromatografii rychlostí 1,5 ml/min. Frakce byly sbírány do mikrozkupek po objemu 1,5 ml od 80. minuty, přičemž protein vyeloval mezi 85. a 95. minutou.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH=8,5)	50 mmol \cdot dm ⁻³	50 ml
NaCl	500 mmol \cdot dm ⁻³	29,3 g
DTT	5 mmol \cdot dm ⁻³	0,771 g
glycerol	10 %	100 g

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l.

Tabulka 8: Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii použitého při purifikaci CaMKK2 W445F mutantu

3.4 Exprese CaM

Pro expresi kalmodulinu bylo z glycerolové konzervy bakterií *E. Coli* BL21(DE3) obsahujících gen pro kalmodulin v plazmidu pET3 odebráno 6x5 μ l do zkumavek obsahujících 5 ml sterilního LB média. Do zkumavek bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku ampicilinu o koncentraci 30 mg/ml (výsledná koncentrace 30 μ g/ml) a bakterie byly kultivované přes noc při teplotě 37 °C za stálého třepání o rychlosti 190 rpm.

Následující den byla každá kultura přelita do 2l Erlenmayerových baněk obsahujících 1000 ml LB média a byl přidán 1 ml zásobního roztoku ampicilinu o koncentraci 30 mg/ml (výsledná koncentrace 30 μ g/ml). Buňky byly kultivované ve třepačce při teplotě 37 °C a rychlosti třepání 190 rpm. Průběžně byla měřena optická hustota při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀). Jako referenční vzorek bylo použito čisté LB médium. Ve chvíli, kdy hodnota OD₆₀₀ vzrostla na 0,4, byla teplota snížena na 25 °C. Při OD₆₀₀ = 0,8 byla exprese

kalmodulinu indukovaná přidáním 1 ml 0,5M zásobního roztoku IPTG do výsledné koncentrace $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Buňky byly poté dále kultivovány v třepačce při teplotě 37°C přes noc.

Další den byl obsah Erlenmayerových baněk přelit do 1l kyvet a centrifugován při rychlosti 3400 rpm a teplotě 4°C po dobu 20 min. Po odlití supernatantu byly pelety obsahující buňky resuspendovány na vortexu ve 250 ml lyzačního pufru (složení viz tabulka 9) a následně zhomogenizovány na magnetické míchačce. Suspenze bakterií byla zmrazena na teplotu -80°C .

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 7,5)	$50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	12,5 ml
0,5M EDTA	$2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	1000 μl
βME	$2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	34,75 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 250 ml.

Tabulka 9: Složení lyzačního pufru pro resuspendaci bakterií při expresi kalmodulinu.

3.4.1 Sonikace

Před sonikací byla suspenze bakterií rozmrazena z teploty -80°C a poté byla 30 minut inkubována s přidavkem 0,02 g lysozymu při teplotě 4°C . Těsně před sonikací byl k buňkám přidán 1 ml 0,1M roztoku PMSF.

Pomocí sonikátoru byla působením ultrazvuku narušena buněčná stěna bakterií. Buňky byly ultrazvuku vystaveny celkem 15 min, vždy 5s ON a 15s OFF. Sonikát byl následně centrifugován při rychlosti 13500 rpm při teplotě 4°C po dobu 40 min. K supernatantu bylo přidáno 1,5 ml 1M zásobního roztoku CaCl_2 do výsledné koncentrace $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.5 Purifikace CaM

3.5.1 Chromatografie na fenyl-sepharose

Při této metodě je jako stacionární fáze použita hydrofobní fenyl-sepharosa. Protein se působením vysoké iontové síly mobilní fáze váže na stacionární fázi a může tak být přečištěn od neproteinových nečistot.

Kolona obsahující 3 ml fenyl-sepharosy byla postupně promyta $2 \times 20 \text{ ml H}_2\text{O}$ a $3 \times 20 \text{ ml}$ pufru A. Poté byl na kolonu nanesen veškerý sonikát a kolona s navázaným kalmodulinem byla promyta $2 \times 20 \text{ ml}$ pufru B a $3 \times 20 \text{ ml}$ pufru C. Protein byl eluován 20 ml pufru D. Složení pufrů je uvedeno v tabulkách 10-13 na straně 30. Kolona byla poté regenerována promytím $3 \times 20 \text{ ml H}_2\text{O}$ a $2 \times 20 \text{ ml 20\% EtOH}$.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 7,5)	$50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	12,5 ml
5M NaCl	$100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	5 ml
1M CaCl_2	$5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,25 ml

Doplněno deionizovanou vodou na objem 250 ml.

Tabulka 10: Složení pufru A pro chromatografii na fenyl-sepharose

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 7,5)	50 mmol · dm ⁻³	10 ml
5M NaCl	100 mmol · dm ⁻³	4 ml
1M CaCl ₂	1 mmol · dm ⁻³	200 µl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 200 ml.

Tabulka 11: Složení pufru B pro chromatografii na fenyl-sepharose

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 7,5)	50 mmol · dm ⁻³	25 ml
5M NaCl	500 mmol · dm ⁻³	50 ml
1M CaCl ₂	1 mmol · dm ⁻³	500 µl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 500 ml.

Tabulka 12: Složení pufru C pro chromatografii na fenyl-sepharose

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 7,5)	50 mmol · dm ⁻³	2,5 ml
5M NaCl	100 mmol · dm ⁻³	1 ml
0,5M EDTA	1,5 mmol · dm ⁻³	100 µl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 50 ml.

Tabulka 13: Složení pufru D pro chromatografii na fenyl-sepharose

3.5.2 Gelová permeační chromatografie

Před nanesením na kolonu byl protein zakonzentrován v koncentrátoru v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5804R rychlostí 3000 rpm při teplotě 4 °C na konečný objem 2 ml. Protein byl centrifugován ve 2min intervalech, mezi nimiž byl vždy promíchán automatickou pipetou.

Gelová permeační chromatografie byla provedena podle postupu popsáném v kapitole 3.3.5. Byla použita kolona HiLoad Superdex 75 (26/600). Složení použitého pufru pro gelovou chromatografii je uvedeno v tabulce 14. Frakce o objemu 1,5 ml byly sbírány od 65. minuty při průtoku 1,5 ml/min.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 7,5)	50 mmol · dm ⁻³	50 ml
NaCl	150 mmol · dm ⁻³	8,77 g
CaCl ₂	1 mmol · dm ⁻³	0,1110 g
TCEP	1 mmol · dm ⁻³	0,2867 g
glycerol	10 %	100 g

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l a pH upraveno na hodnotu 7,5.

Tabulka 14: Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii

3.6 Exprese TEV proteasy

Do 5 ml sterilního LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a chloramfenikol o koncentraci 34 $\mu\text{g/ml}$ bylo přidáno 10 μl glycerolové zásoby buněk BL21(DE3)RIL obsahujících gen pro expresi TEV proteasy. Kultura byla inkubována přes noc za konstantního třepání o rychlosti 200 rpm při teplotě 37 °C.

Následující den byla kultura přenesena do připravených 900 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a chloramfenikol o koncentraci 34 $\mu\text{g/ml}$. Buněčná kultura byla inkubována za konstantního třepání o rychlosti 190 rpm při teplotě 37 °C do optické hustoty $\text{OD}_{600} = 0,8$, kdy byla exprese indukována pomocí 1 ml 0,5M roztoku IPTG (finální koncentrace 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a buňky byly inkubovány přes noc při teplotě 30 °C.

Následující den byla narostlá buněčná kultura centrifugována při teplotě 4 °C a rychlosti 3400 rpm po dobu 20 min. Peleta byla resuspendována ve 100 ml lyzačního pufru (složení viz tabulka 15 na straně 32) a zamrazena do -80°C .

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
10× PBS	1×	10 ml
NaCl	1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	5,84 g
imidazol	2 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,0136 g
βME	4 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	28 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 100 ml.

Tabulka 15: Složení lyzačního pufru pro purifikaci TEV proteasy

3.6.1 Sonikace

Před sonikací byla suspenze buněk obsahujících exprimovanou TEV proteasu rozmrazena a naředěna 100 ml lyzačního pufru (složení viz tabulka 15) pro zvětšení objemu. Buňky byly inkubovány s 0,01 g lysozymu po dobu 2 hod. Poté byly bakterie vystaveny ultrazvuku (kapitola 3.4.1) po dobu celkem 15 min (15 s ON, 45 s OFF). Sonikát byl centrifugován při rychlosti 13500 rpm a získaný supernatant byl použit pro další krok purifikace.

3.7 Purifikace TEV proteasy

Při purifikaci TEV proteasy byla provedena niklová chelatační chromatografie (kapitola 3.3.1). Složení použitých pufrů je uvedeno v tabulkách 16 a 17). Poté byla pro ověření čistoty provedena SDS-PAGE (kapitola 3.8) a následně dialýza (kapitola 3.3.2). Složení dialyzačního pufru je uvedeno v tabulce 18. Další den byla TEV proteasa zředěna dialyzačním pufrem do hodnoty absorbance $A_{280} = 1,03$, což odpovídá koncentraci TEV proteasy v roztoku 0,838 mg/ml . Protein byl rozdělen do mikrozkuvek po 1 ml a uchováván při teplotě -80°C .

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
10× PBS	1×	100 ml
NaCl	500 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	29,2 g
imidazol	1 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,07 g
βME	2 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	139 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l.

Tabulka 16: Složení pufru E pro purifikaci TEV proteasy

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
10× PBS	1×	100 ml
NaCl	500 mmol · dm ⁻³	29,2 g
imidazol	600 mmol · dm ⁻³	40,8 g
βME	2 mmol · dm ⁻³	139 μl

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l a pH upraveno na hodnotu 8.

Tabulka 17: Složení pufru F pro purifikaci TEV proteasy.

Látka	Výsledná koncentrace	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH=7,5)	50 mmol · dm ⁻³	50 ml
DTT	5 mmol · dm ⁻³	0,7 g
glycerol	10 %	100 g
0,5M EDTA	1 mmol · dm ⁻³	2 ml

Doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l.

Tabulka 18: Složení dialyzačního pufru pro purifikaci TEV proteasy.

3.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforéza je elektromigrační metoda probíhající v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného. Dodecylsíran sodný je povrchově aktivní látka, která denaturuje proteiny a udílí jim jednotný záporný náboj. Větší molekuly mají ve vláknité struktuře polyakrylamidového gelu nižší mobilitu a putují pomaleji než malé. Molekuly se tedy rozdělují podle své velikosti a potažmo i molekulové hmotnosti.

Při purifikacích CaMKK2 W374 mutantu a kalmodulinu byly použity 12% separační a 5% zaváděcí gel. Při purifikaci TEV proteasy byly použity 15% separační a 5% zaváděcí gel. Složení gelů je uvedeno v tabulkách 19 a 21.

Látka	V _{12%gel}	V _{15%gel}
Akrylamid/Bisakrylamid	3 ml	3,75 ml
Pufr pro separační gel	2 ml	2 ml
Deionizovaná voda	2,6 ml	1,75 ml
10% APS	45 μl	45 μl
TEMED	5 μl	5 μl

Tabulka 19: Složení 12% a 15% separačního polyakrylamidového gelu použitého při SDS-PAGE.

Látka	Odměřené množství
2M Tris-HCl, pH 8,8	75 ml
10% SDS	4 ml
dH ₂ O	21 ml

Tabulka 20: Složení pufru pro separační gel.

Látka	Odměřené množství
Akrylamid/Bisakrylamid	0,5 ml
Pufr pro zaváděcí gel	1 ml
Deionizovaná voda	2,25 ml
10% APS	45 μ l
TEMED	5 μ l

Tabulka 21: Složení zaváděcího polyakrylamidového gelu použitého při SDS-PAGE.

Látka	Odměřené množství
1M Tris-HCl, pH 6,8	50 ml
10% SDS	4 ml
dH ₂ O	46 ml

Tabulka 22: Složení pufru pro zaváděcí gel.

3.8.1 Příprava vzorků a jejich analýza

Během všech purifikací proteinů (kapitoly 3.3, 3.5 a 3.7) byly po jednotlivých krocích odebírány vzorky po 20 μ l pro kontrolu čistoty proteinu a úspěšnosti dané metody. Ke každému vzorku bylo přidáno 5 μ l pufru pro přípravu vzorku (složení viz tabulka 23). Poté byly vzorky denaturovány zahřátím na 100 °C.

Při každé SDS-PAGE bylo do prvního žlábků gelu nanášeno 5 μ l standardu molekulových hmotností Protein Blue Standard a do dalších žlábků jednotlivé vzorky. Aparatura pro SDS-PAGE byla naplněna 1 \times koncentrovaným elektroforetickým pufrem (složení 10 \times koncentrovaného zásobního roztoku viz tabulka 24). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V.

Látka	Odměřené množství
1M Tris-HCl, pH 6,8	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
β ME	0,5 ml
1% bromfenolová modř	1 ml
dH ₂ O	0,9 ml

Tabulka 23: Složení pufru pro přípravu vzorku na SDS-PAGE.

Látka	Odměřené množství
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

Doplňit deionizovanou vodou do 1 l.

Tabulka 24: Složení 10× koncentrovaného elektroforetického pufru pro SDS.

3.8.2 Vizualizace gelů

Po skončení SDS-PAGE byly gely přivedeny k varu v destilované vodě, aby došlo k odstranění přebytečného dodecylsírany sodného. Poté byly gely přivedeny k varu a 20 min inkubovány v barvicím roztoku Coomassie Staining solution (složení viz tabulka 25), aby došlo k obarvení proteinů v gelu. Následně byly gely vloženy do destilované vody a přivedeny k varu, čímž došlo k odbarvení gelů, přičemž proteiny zůstaly i po tomto kroku obarveny.

Látka	Odměřené množství
Coomassie Blue R-250	1 g
methanol	450 ml
deionizovaná voda	450 ml
konc. kyselina octová	100 ml

Tabulka 25: Složení barvicího roztoku po barvení gelů pomocí Coomassie Blue R-250.

3.9 Měření přístupnosti Trp³⁷⁴ pomocí zhášení stacionární tryptofanové fluorescence akrylamidem

3.9.1 Příprava vzorků

Frakce CaMKK2 W374 získané po gelové permeační chromatografii (kapitola 3.3.5) byly sloučeny a pomocí dialýzy (kapitola 3.3.2) převedeny do pufru určeného pro měření tryptofanové fluorescence (tabulka 26). Na nanofotometru IMPLN byla změřena proteinová koncentrace připraveného CaMKK2 W374 a kalmmodulinu. CaMKK2 W374 získaný z druhé purifikace zakonzentrován a poté naředěn tak, aby se proteinové koncentrace obou roztoků rovnaly. Pro přípravu vzorků tedy byl použit roztok CaMKK2 W374 o koncentraci $15,5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a roztok kalmmodulinu o koncentraci $220 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro zhášení byl připraven roztok akrylamidu o koncentraci $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Složení měřených vzorků je uvedeno v tabulce 27.

Pufr pro měření fluorescence	1 l
50mM Tris-HCl (pH=7,5)	50 ml 1M zás. roztoku
150mM NaCl	8,77 g
1mM CaCl ₂	0,1110 g
10% glycerol	100 g
1mM TCEP	0,2867 g

Tabulka 26: Složení pufru použitého při měření fluorescenčního záření CaMKK2 W374

Vzorek č.	$V_{\text{CaMKK2}}/\mu\text{l}$	$V_{\text{CaM}}/\mu\text{l}$
1	1000	0
2	1000	0
3	1000	80
4	500	40
5	500	40

Tabulka 27: Složení vzorků pro měření tryptofanové fluorescence

3.9.2 Měření zhášení fluorescence

Fluorescence CaMKK2 W374 byla měřena na spektrofleurimetru PC1 s použitím štěrbin velikosti 1 mm. Nejprve byla proměřena excitační a emisní spektra pro CaMKK2 W374 samotný a pro směs CaMKK2 W374 s kalmodulinem. Excitační spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 200–300 nm při emisní vlnové délce 325 nm a emisní spektra v rozsahu vlnových délek 320–400 nm při excitační vlnové délce 295 nm.

Následně byla fluorescence CaMKK2 W374 zhášena titrací 3M roztokem akrylamidu. Pro každou koncentraci akrylamidu ve vzorku bylo změřeno 10 hodnot intenzity fluorescence tryptofanu při excitační vlnové délce 295 nm a při emisní vlnové délce 325 nm. Hodnoty koncentrací přidaného akrylamidu jsou uvedeny v tabulce 28.

$[Q]/\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Vzorky č. 1–2)	$[Q]/\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Vzorky č. 3–5)
0,0	0,0
14,9	13,8
29,7	27,5
44,3	41,1
73,2	67,9
101,4	94,2
129,2	120,0
169,8	157,9
209,3	194,8
247,7	230,8
309,4	288,7
368,4	344,3

Tabulka 28: Koncentrace akrylamidu v průběhu titrace. $[Q]$ je koncentrace akrylamidu ve vzorku při daném kroku titrace. Vzorky č. 1 a 2 obsahují pouze CaMKK2 W374. Vzorky č. 3–5 obsahují CaMKK2 W374 v přítomnosti CaM.

Pro každou koncentraci akrylamidu také byla změřena absorbance při obou vlnových délkách, tedy 295 nm a 325 nm.

3.10 Vyhodnocení výsledků

Při každém měření bylo získáno deset hodnot intenzity fluorescenčního záření pro každou koncentraci akrylamidu v průběhu titrace. Nejprve byla spočítána průměrná hodnota intenzity fluorescenčního záření I pro každý krok titrace a směrodatná odchylka. Pro tyto výpočty byly v programu MS Excel použity funkce PRŮMĚR a SMODCH.

Dalším krokem výpočtu byla korekce na změnu objemu (rovnice 11), kde I_{pred} je průměrná hodnota intenzity fluorescence před korekcí, I_v je hodnota fluorescence po ko-

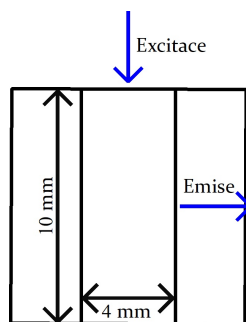
reakci na objem, V_0 je původní objem vzorku bez akrylamidu a V je součet původního objemu vzorku a kumulativního objemu přidaného akrylamidu.

$$I_V = \frac{V_0}{V} \cdot I_{\text{pred}} \quad (11)$$

Dále byla provedena korekce na vnitřní filtr (rovnice 12), kde F označuje intenzitu fluorescence po obou korekcích, I_V označuje intenzitu fluorescence po korekci na změnu objemu vzorku, A_{295} je absorbance změřená při vlnové délce 295 nm a A_{325} je absorbance změřená při vlnové délce 325 nm [51].

$$F = I_V \cdot \exp_{10} \left(\frac{A_{295} + 0,4 \cdot A_{325}}{2} \right) \quad (12)$$

Tato korekce je nutná z toho důvodu, že vzorek určitou malou část procházejícího záření absorbuje a tím snižuje intenzitu. Protože byla použita kyveta s obdélníkovým profilem (obrázek 11), byla absorbance při emisní vlnové délce vynásobena koeficientem 0,4. Tento koeficient odpovídá rozdílu mezi vnitřními rozměry kyvety ve směru excitačního záření a ve směru emisního záření.



Obrázek 11: Průřez kyvetou použitou pro měření fluorescenčního záření CaMKK2 W374 mutantu a její rozměry. Modré šipky označují směr excitačního a emisního záření.

Pro každý krok titrace každého vzorku byly spočítány hodnoty $F_0/\Delta F$ a $1/[Q]$, přičemž $[Q]$ je koncentrace akrylamidu v určitém kroku titrace, F_0 je intenzita tryptofanové fluorescence vzorku před titrací a $\Delta F = F_0 - F$, kde F je intenzita tryptofanové fluorescence při příslušném kroku titrace. V programu Origin byly pro jednotlivé vzorky vytvořeny grafy, do kterých byly podle rovnice (13) na osu x vyneseny hodnoty $1/[Q]$ menší než 10 a na osu y hodnoty $F_0/\Delta F$. Vynesené body byly proloženy lineární regreseí, z jejichž parametrů byla odečtena hodnota posunu na ose y , tedy $1/f_a$, a hodnota směrnice, tedy $1/(f_a \cdot K_a)$. Z těchto parametrů byla spočítána frakce Trp³⁷⁴ přístupná fluoroforu f_a a její Stern-Volmerova zhášecí konstanta K_a . Odvození rovnice (13) je uvedeno na straně 10.

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a \cdot K_a \cdot [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (13)$$

Při každém kroku při vyhodnocení byla taktéž přepočítána standardní chyba měření podle standardních pravidel pro propagaci chyby.

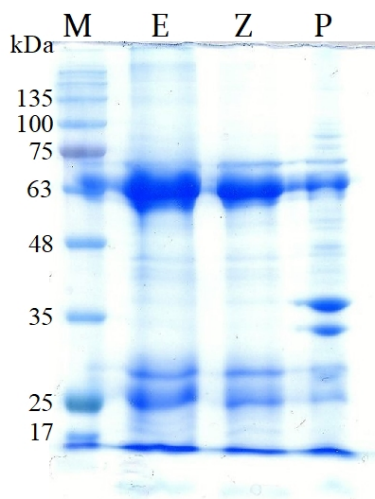
4 Výsledky

4.1 Purifikace CaMKK2 W374

Jedním z cílů práce byla purifikace CaMKK2 W374. Hlavními kroky purifikace byla niklová chelatační chromatografie, štěpení TEV proteasou a gelová permeační chromatografie. Po každém z těchto kroků byla provedena SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu (složení uvedeno v tabulce 19 na straně 33). Purifikace byla provedena celkem 2×, ukázané jsou gely jedné z nich.

4.1.1 Niklová chelatační chromatografie

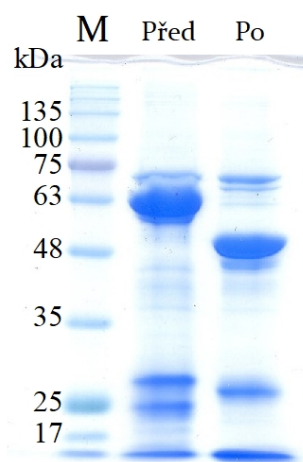
Při niklové chelatační chromatografii byl protein eluován gravitačně najednou do 10 ml dialyzačního pufru. Během eluce byla vždy odebrána jedna kapka proteinu nezředěného dialyzačním pufrům. Přítomnost a čistota proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu (Obrázek 12). Po vizualizaci proteinu na gelu byla přítomnost proteinu v eluovaném roztoku prokázána porovnáním molekulové hmotnosti obarveného vzorku (~ 63000) s očekávanou molekulovou hmotností (57494).



Obrázek 12: Vizualizovaný 12% gel SDS-PAGE provedený po niklové chelatační chromatografii. Na gel bylo nanášeno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M, z *angl. marker*), vzorek eluovaného proteinu (E), vzorek proteinu zředěného dialyzačním pufrům (Z) a vzorek pelety po sonikaci (P). Nanášené vzorky obsahovaly vždy 20 μ l odebraného proteinu a 5 μ l vzorkového pufru.

4.1.2 Štěpení TEV proteasou

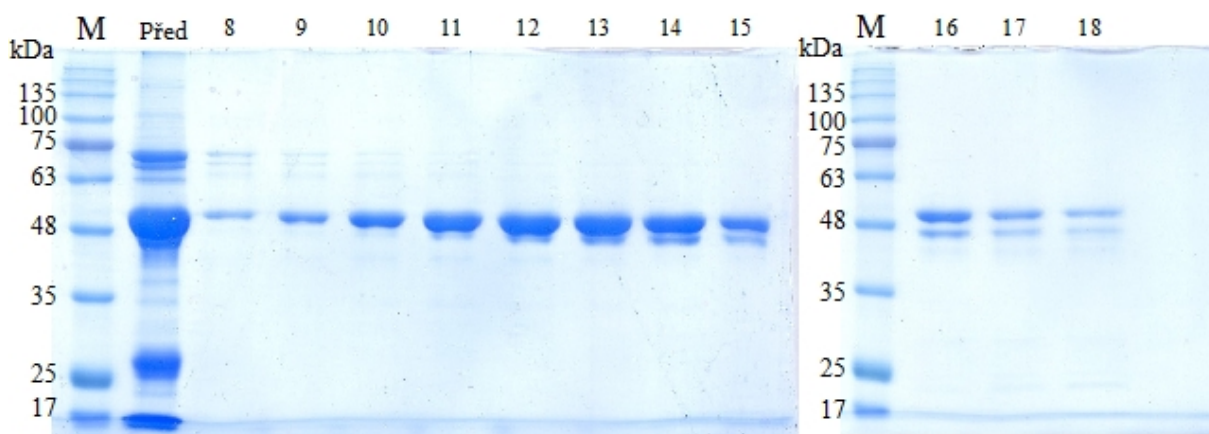
Úspěšnost odštěpení histidinové kotvy z CaMKK2 byla ověřena provedením SDS-PAGE s použitím 12% polyakrylamidového gelu (obrázek 13 na straně 39). Po vizualizaci proteinu na gelu byla úspěšnost štěpení prokázána porovnáním molekulové hmotnosti obarveného vzorku po odštěpení kotvy (~ 43000) s očekávanou molekulovou hmotností (47840). Z obrázku 13 je patrné, že štěpení proběhlo úspěšně a téměř žádný protein nezůstal v původní formě.



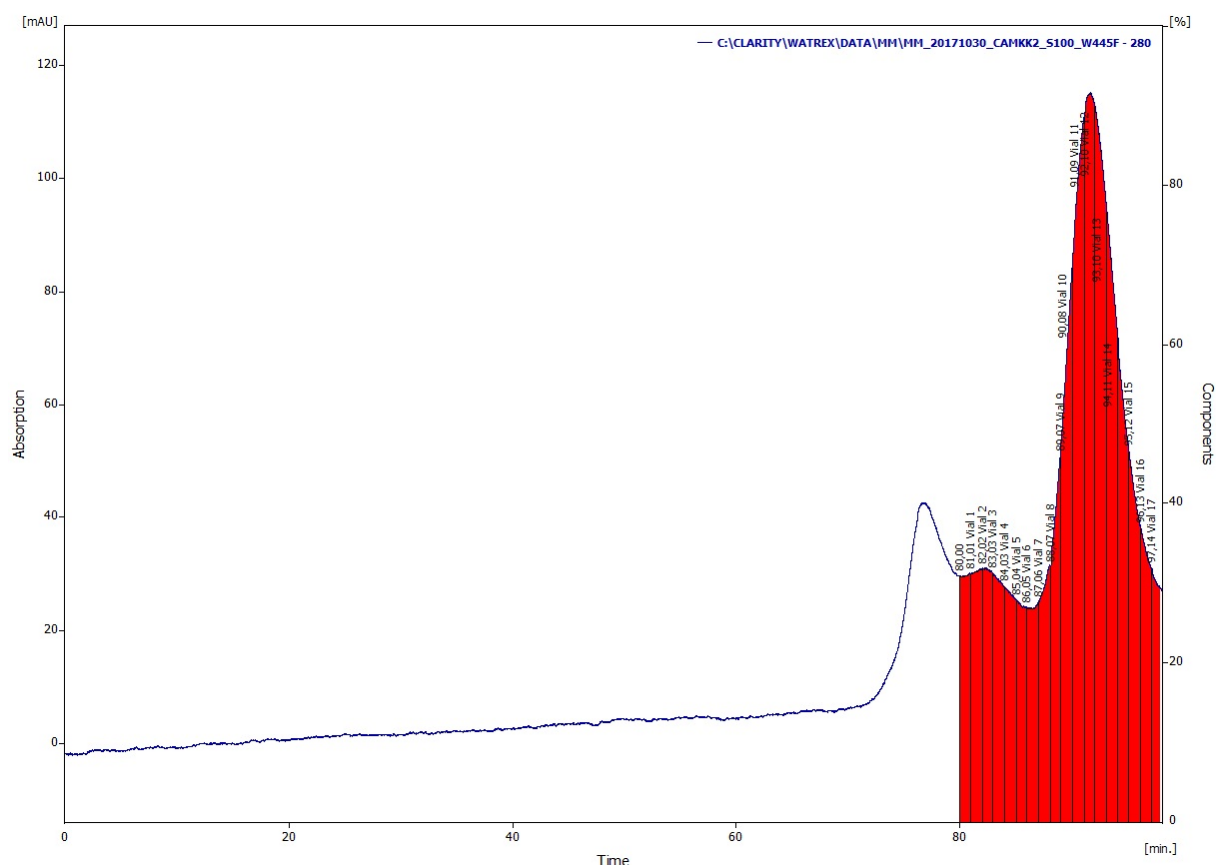
Obrázek 13: Vizualizovaný 12% gel SDS-PAGE provedený po štěpení TEV proteasou. Na gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M), vzorek proteinu před štěpením a vzorek proteinu po štěpení. Nanášené vzorky obsahovaly vždy 20 μ l odebraného proteinu a 5 μ l vzorkového pufru.

4.1.3 Gelová permeační chromatografie

Dalším krokem purifikace CaMKK2 W374 mutantu byla gelová permeační chromatografie. Během eluce byly jímány frakce po 1,5 ml. Na základě chromatogramu získaném během eluce (obrázek 15) byly vzorky pro SDS-PAGE odebrány z frakcí 8-18. Následně byla přítomnost a čistota proteinu v těchto frakcích ověřena pomocí SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu (Obrázek 14). Pro následné zhášení tryptofanové fluorescence byl použitý frakce 11-14. Proteinová koncentrace těchto frakcí byla 0,155 mg/ml v objemu 6 ml, což odpovídá výtěžku 0,930 mg a koncentraci 3,24 μ mol \cdot dm⁻³. Před samotným měřením intenzity fluorescence byla koncentrace roztoku upravena na 15,5 μ mol \cdot dm⁻³.



Obrázek 14: Vizualizované 12% gely SDS-PAGE provedené po gelové permeační chromatografii při purifikaci CaMKK2 W374 mutantu. Na levý gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M), vzorek proteinu odebraný před gelovou permeační chromatografií, a poté vzorky frakcí 8–15. Na pravý gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M) a vzorky odebrané z frakcí 16-18. Nanášené vzorky obsahovaly vždy 20 μ l odebraného proteinu a 5 μ l vzorkového pufru.



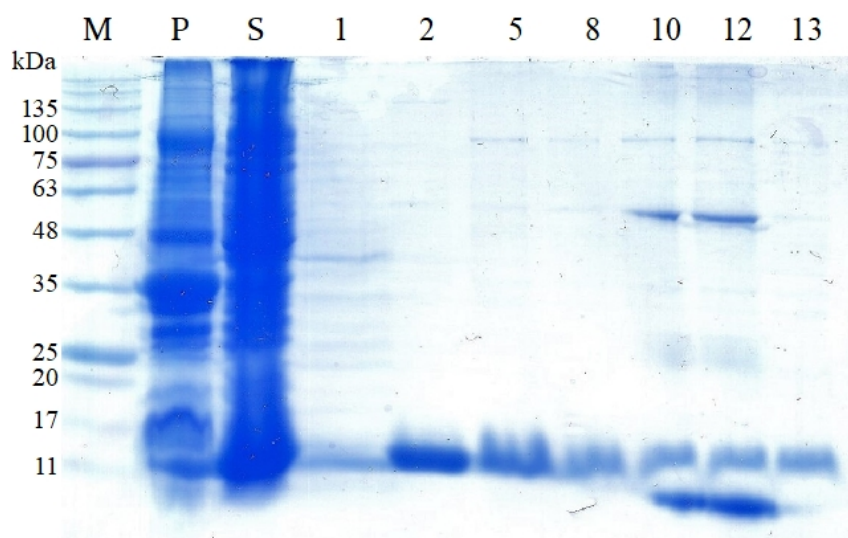
Obrázek 15: Chromatogram získaný během gelové permeační chromatografie při purifikaci CaMKK2 W374 mutantu.

4.2 Purifikace CaM

Nejdůležitějšími kroky při purifikaci kalmodulinu byla chromatografie na fenyl-sepharose a gelová permeační chromatografie. Po každém z těchto kroků byla provedena SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu (složení uvedeno v tabulce 19 na straně 33).

4.2.1 Chromatografie na fenyl-sepharose

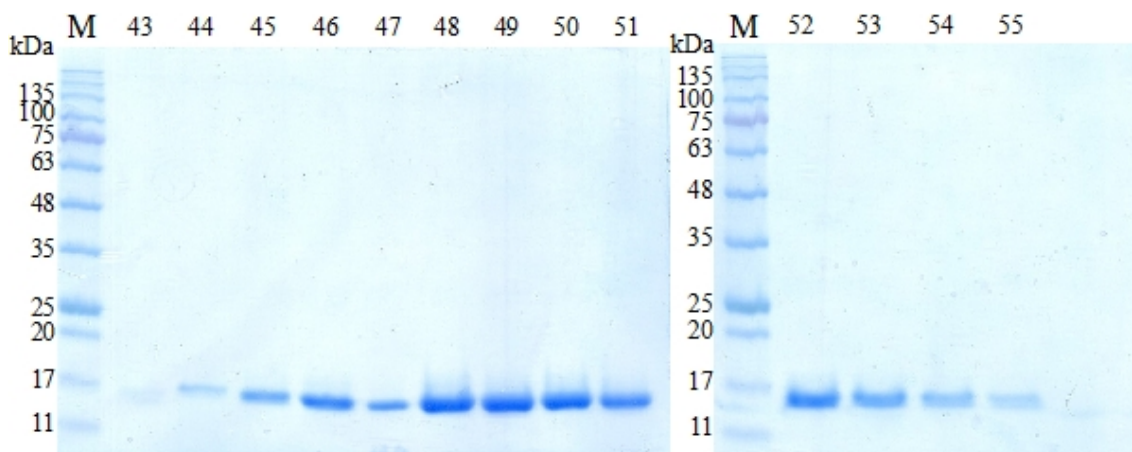
Při eluci proteinu během chromatografie na fenyl-sepharose bylo najímáno 13 frakcí o objemu přibližně 1,5 ml. Přítomnost a čistota kalmodulinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu (obrázek 16 na straně 41). Na vizualizovaném gelu byla přítomnost kalmodulinu v sesbíraných frakcích prokázána porovnáním molekulové hmotnosti obarveného vzorku (~ 17000) s očekávanou molekulovou hmotností (16838). Vzhledem k nečistotám ve frakcích 10 a 12 byly pro další kroky purifikace sloučeny frakce 2–9.



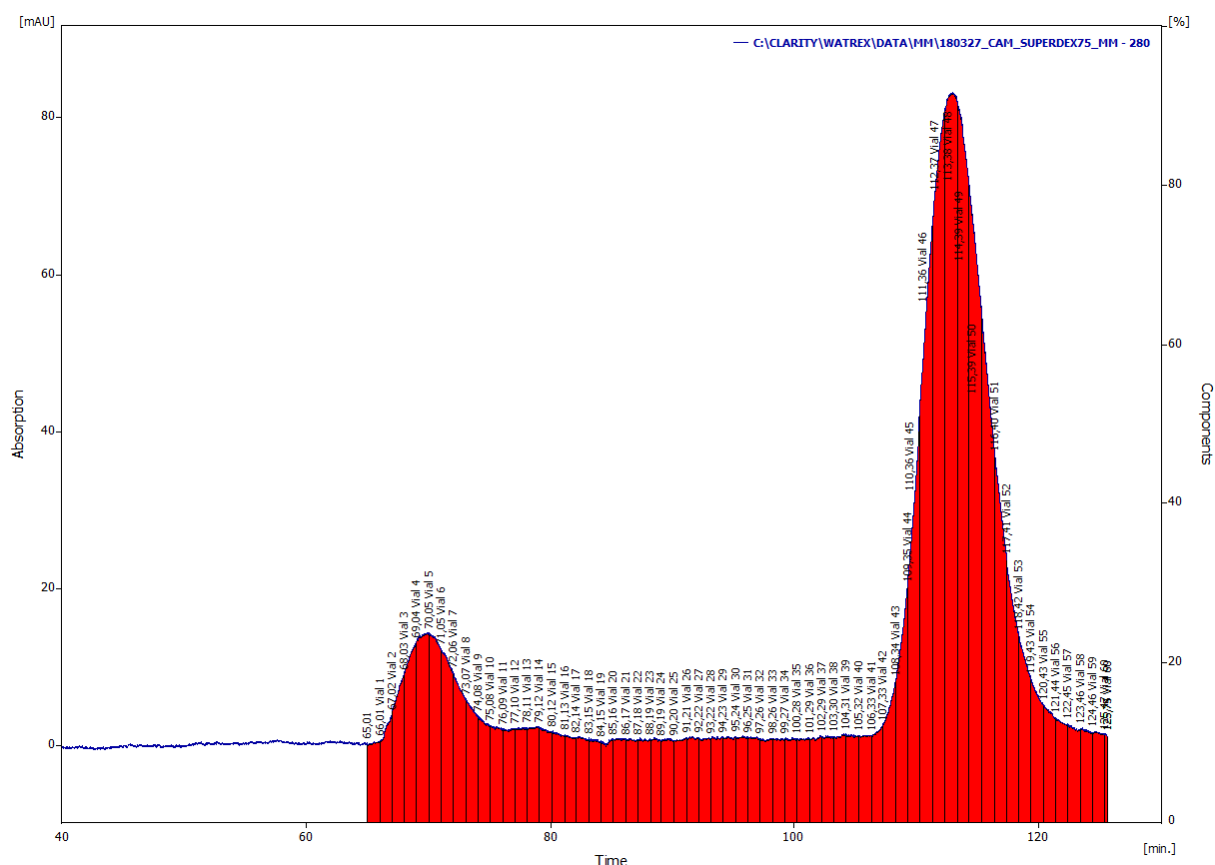
Obrázek 16: Vizualizovaný 12% gel SDS-PAGE provedený po fenyl-sepharosové chromatografii při purifikaci kalmodulinu. Na gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M) a poté vzorky frakcí příslušně očíslovaných. Nanášené vzorky obsahovaly vždy 20 μ l odebraného proteinu a 5 μ l vzorkového pufru.

4.2.2 Gelová permeační chromatografie

Dalším krokem purifikace kalmodulinu byla gelová permeační chromatografie, kdy byly během eluce jímány frakce po 1,5 ml. Podle chromatogramu získaného během eluce (obrázek 18 na straně 42) byly vzorky pro SDS-PAGE odebrány z frakcí 43–55, jejichž čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu (obrázek 17). Byly sloučeny frakce 44–54, které byly zakoncentrovány na výslednou proteinovou koncentraci 3,41 mg/ml v objemu 900 μ l, což odpovídá výtěžku 3,07 mg kalmodulinu.



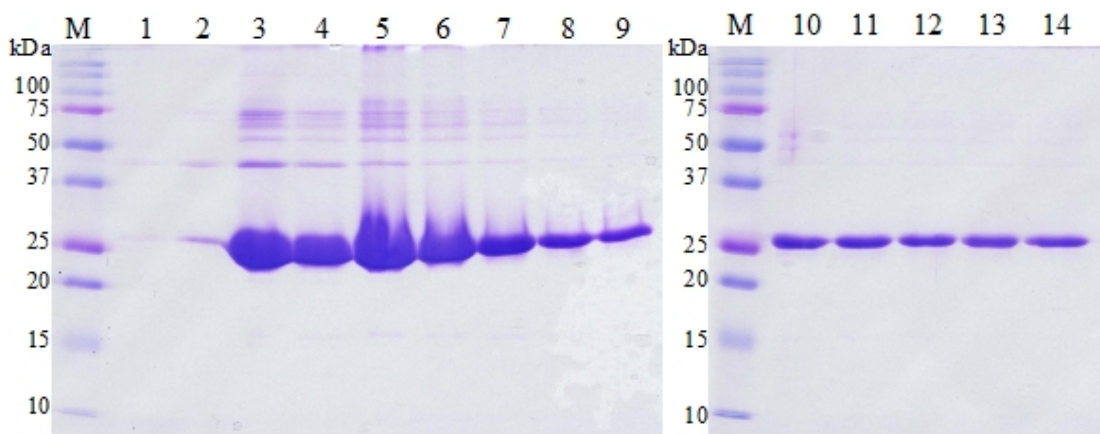
Obrázek 17: Vizualizované 12% gely SDS-PAGE provedené po gelové permeační chromatografii při purifikaci kalmodulinu. Na levý gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M) a poté vzorky frakcí 43–51. Na pravý gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M) a poté vzorky frakcí 52–55. Nanášené vzorky obsahovaly vždy 20 μ l odebraného proteinu a 5 μ l vzorkového pufru.



Obrázek 18: Chromatogram získaný během gelové permeační chromatografie při purifikaci kalmodulinu.

4.3 Purifikace TEV proteasy

Prvním krokem purifikace TEV proteasy byla niklová chelatační chromatografie, při které bylo gravitační elucí najímáno 14 frakcí o objemu cca 1,5 ml. Přítomnost a čistota TEV proteasy byla ověřena pomocí SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu (obrázek 19). Pro další kroky purifikace byly sloučeny frakce 3–14.

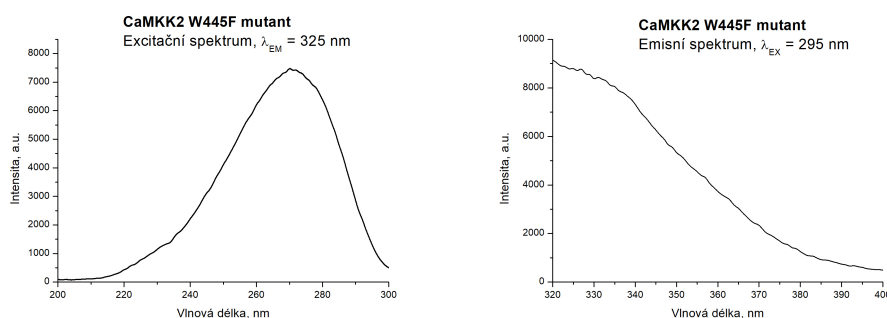


Obrázek 19: Vizualizované 15% gely SDS-PAGE provedené po niklové chelatační chromatografii při purifikaci TEV proteasy. Na levý gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M) a poté vzorky frakcí 1–9, na pravý gel bylo naneseno zleva 5 μ l standardu molekulových vah (M) a poté vzorky frakcí 10–14. Nanášené vzorky obsahovaly vždy 20 μ l odebraného proteinu a 5 μ l vzorkového pufru.

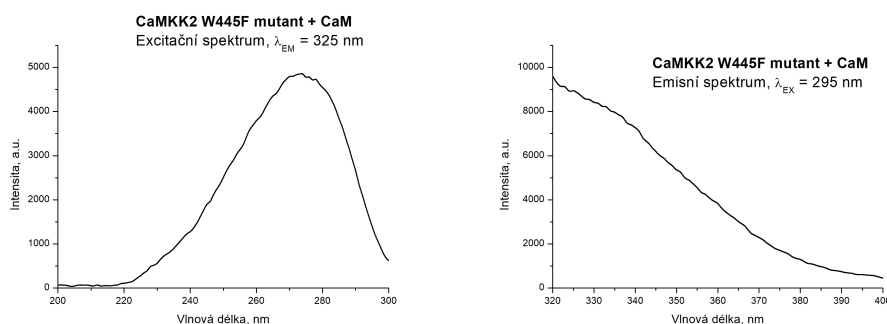
Poté byla provedena dialýza a následně byla změřena absorbance roztoku TEV proteasy, která byla naředěna tak, aby hodnota absorbance při vlnové délce 280 nm měla hodnotu 1,03. Tato hodnota odpovídá koncentraci 0,838 mg/ml. Celkem bylo získáno 35 ml TEV proteasy, což odpovídá celkovému výtěžku 29 mg.

4.4 Měření excitačních a emisních spekter CaMKK2 W374 mutantu

Spektra naměřená postupem popsáním v kapitole 3.9 byla zobrazena v programu Origin. Porovnáním excitačního a emisního spektra CaMKK2 W374 mutantu v nepřítomnosti (20) a v přítomnosti kalmodulinu (21) lze konstatovat, že interakce s CaM nemá výrazný vliv na tvar excitačního a emisního spektra Trp³⁷⁴.



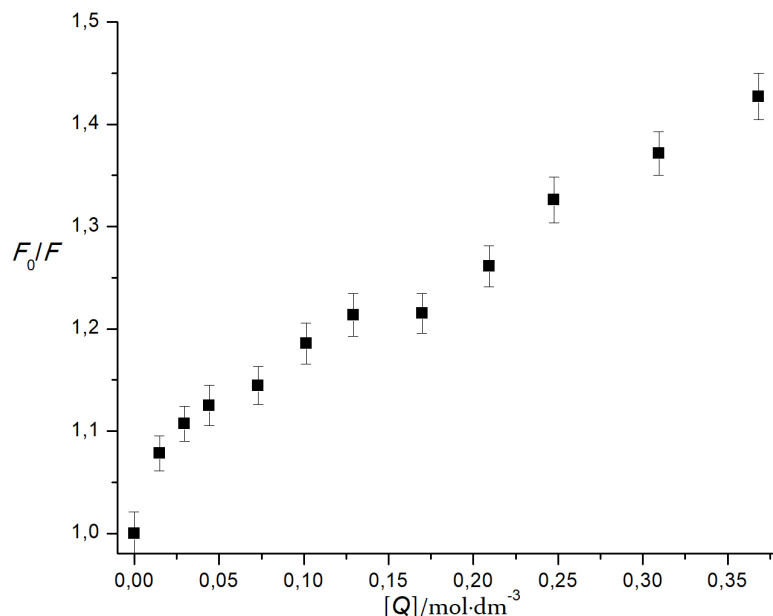
Obrázek 20: Excitační a emisní spektrum CaMKK2 W374 mutantu v nepřítomnosti kalmodulinu



Obrázek 21: Excitační a emisní spektrum CaMKK2 W374 mutantu v nepřítomnosti kalmodulinu

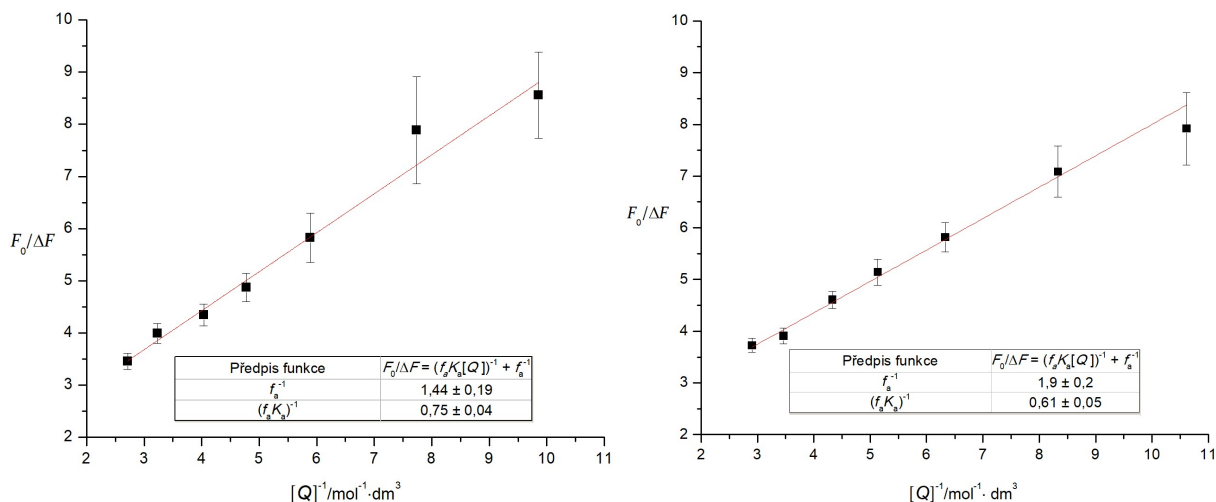
4.5 Měření přístupnosti Trp³⁷⁴ pomocí zhášení stacionární tryptofanové fluorescence akrylamidem

Hlavním cílem práce bylo určení přístupnosti pozice 374 ve struktuře CaMKK2 W374. Na základě nejbližšího okolí Trp³⁷⁴ (obrázek 10 na straně 21) lze říci, že tryptofan na této pozici je tzv. pohřbený. Proto je pravděpodobné, že zhášení bude účinné jen částečně a bude řídit závislostí popsanou modifikovanou Stern-Volmerovou rovnicí (10). Data vynesena do grafu podle Stern-Volmerovy rovnice (3) (obrázek 22) neposkytují lineární závislost a tedy potvrzují předpoklad, že je zhášena pouze část Trp³⁷⁴.



Obrázek 22: Graf vytvořený podle klasické Stern-Volmerovy rovnice pro vzorek CaMKK2 W374 mutant v nepřítomnosti kalmodulinu. Z pozice bodů v grafu lze určit, že se zhášení fluorescence Trp³⁷⁴ neřídí klasickou Stern-Volmerovou rovnicí (3), ale modifikovanou Stern-Volmerovou rovnicí (10).

Data byla vyhodnocena podle postupu popsáném v kapitole 3.10 na straně 3.10. Ze získané lineární závislosti $F_0/\Delta F$ na $[Q]^{-1}$ pro CaMKK2 W374 v nepřítomnosti a v přítomnosti kalmodulinu (obrázek 23) byly spočítány hodnoty přístupné frakce Trp^{374} f_a a Stern-Volmerovy konstanty této frakce K_a (tabulka 29).



Obrázek 23: Modifikované Stern-Volmerovy grafy pro zhášení fluorescence CaMKK2 W374 akrylamidem. Vlevo zobrazeny výsledky měření fluorescence CaMKK2 W374 v nepřítomnosti kalmodulinu, vpravo v přítomnosti kalmodulinu.

CaMKK2 W374		
	f_a	$K_a/\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$
– CaM	$0,69 \pm 0,09$	$1,9 \pm 0,3$
+ CaM	$0,53 \pm 0,06$	$3,1 \pm 0,4$

Tabulka 29: Výsledné hodnoty přístupné frakce Trp^{374} f_a a její Stern-Volmerovy konstanty K_a pro protein CaMKK2 W374 v nepřítomnosti a v přítomnosti kalmodulinu.

Měření naznačila, že interakce CaMKK2 s kalmodulinem způsobuje strukturní změny v blízkém okolí Trp^{374} . Na základě získaných hodnot přístupné frakce f_a a Stern-Volmerovy konstanty K_a pro CaMKK2 W374 v nepřítomnosti a v přítomnosti kalmodulinu lze konstatovat, že interakce s kalmodulinem snižuje přístupnost Trp^{374} .

5 Diskuse

Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasakinas 2 (CaMKK2) je důležitou součástí tzv. CaMK kaskády, která se podílí na mnoha procesech v těle, jako např. na genové transkripci, potlačení apoptózy nebo utváření paměti. CaMKK2 je stejně jako ostatní členové kaskády závislá na aktivaci prostřednictvím interakce s komplexem Ca^{2+} /CaM, protože kvůli překryvu autoinhibiční a Ca^{2+} /CaM-vazebné domény vazba kalmodulinu způsobuje blokaci interakce autoinhibiční domény s kinasovou doménou. Tato inhibující interakce může být také potlačena samotnou kinasou, konkrétně úsekem 23 aminokyselin na jejím N-konci, který vyvolává autoaktivaci CaMKK2.

Komplex Ca^{2+} /CaM se váže na všechny kinasy CaMK kaskády. Struktura CaMKK2 se liší od struktury ostatních kinas CaMK kaskády, zejména v místě blízkém autoinhibiční doméně. Zatímco většina ostatních proteinkinas (např. PKA nebo CaMKIV) obsahují ve své struktuře α D-helix, ve struktuře CaMKK2 je tento úsek nahrazen hydrofobní β 5- α E-smyčkou. Tato strukturní odlišnost se nachází v místě 274-284 a je blízko autoinhibiční domény a způsobuje tak odlišnost interakce mezi autoinhibiční a kinasovou doménou oproti ostatním kinasám. Na základě krystalové struktury CaMKK2 (obrázek 1 na straně 9 a obrázky 10 na straně 21) bylo zjištěno, že v blízkosti tohoto místa se také nachází Trp³⁷⁴.

Cílem práce bylo pokusit se zjistit, zda vazba komplexu Ca^{2+} /CaM ovlivňuje strukturu CaMKK2 v okolí β 5- α E-smyčky a sousedního α E-helixu.

Pro zjištění vlivu vazby Ca^{2+} /CaM na strukturu CaMKK2 bylo využito schopnosti indolové skupiny tryptofanového zbytku emitovat fluorescenční záření a ovlivňovat jeho intenzitu tzv. zhášedlem. Sledovaný Trp³⁷⁴ je však ve struktuře proteinu pohřbený a proto jeho přístupnost zhášedlu je pouze částečná a závisí na neustálém pohybu molekuly a neustálých změnách terciární struktury proteinu.

V primární struktuře CaMKK2 se nachází dva tryptofanové zbytky, Trp³⁷⁴ a Trp⁴⁴⁵, přičemž Trp³⁷⁴ se nachází v blízkosti β 5- α E-smyčky. Nejprve byl proto připraven mutant CaMKK2 W445F, tedy protein, v jehož primární struktuře je Trp⁴⁴⁵ nahrazen fenylalaninovým zbytkem a protein tak obsahuje pouze jediný tryptofan na pozici 374. Takto připravený mutant byl úspěšně vypurifikován s výtěžkem 0,930 mg. Pro další měření byl protein použit ve formě roztoku proteinu v pufru o proteinové koncentraci $15,5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro zjištění vlivu interakce s komplexem Ca^{2+} /CaM byl použit vypurifikovaný kalmodulin v roztoku o koncentraci $220 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Připravený protein byl titrován akrylamidem a během titrace byla měřena intenzita fluorescence Trp³⁷⁴. Měření bylo provedeno opakovaně pro vzorek CaMKK2 v nepřítomnosti i v přítomnosti kalmodulinu. Získaná data byla upravena podle modifikované Stern-Volmerovy rovnice (rovnice (10) na straně 22) a vynesena do grafů.

Ze získaných modifikovaných Stern-Volmerových rovnic bylo zjištěno, že interakce s kalmodulinem pravděpodobně ovlivňuje strukturu CaMKK2 v oblasti Trp³⁷⁴. Přístupnost dané oblasti po interakci s kalmodulinem klesla z 69 % na 53 %, což naznačuje, že interakce s kalmodulinem a tedy aktivace CaMKK2 způsobí větší pohřbení Trp³⁷⁴ ve struktuře. Ke změně dochází také v případě Stern-Volmerovy zhášecí konstanty přístupné frakce tryptofanu K_a .

Tato práce ukázala, že vazba kalmodulinu na CaMKK2 ovlivňuje strukturu kinasové domény CaMKK2 v oblasti β 5- α E-smyčky a sousedního α E-helixu. To naznačuje, že v nepřítomnosti kalmodulinu interaguje tato oblast kinasové domény s autoinhibiční doménou, zatímco po vazbě kalmodulinu se tato interakce mění nebo úplně ztrácí.

6 Závěr

- Byla exprimována a vypurifikována CaMKK2 W374 v čistotě a množství dostatečném pro fluorescenční měření. Úspěšnost purifikace byla ověřena pomocí SDS-PAGE.
- Byl exprimován a vypurifikován kalmodulin (CaM) v čistotě a množství dostatečném pro fluorescenční měření. Úspěšnost purifikace byla ověřena pomocí SDS-PAGE.
- Byla exprimována a vypurifikována TEV proteasa použita pro štěpení CaMKK2 W374. Úspěšnost purifikace byla ověřena pomocí SDS-PAGE.
- Pomocí metody dynamického zhášení fluorescence byla naznačena změna přístupnosti Trp³⁷⁴ CaMKK2 W374 při interakci s kalmodulinem.

Reference

- [1] H. Tokumitsu, Takahashi, K. Eto, S. Yano, T. R. Soderling, and M. Muramatsu. Substrate recognition by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274:15803–15810, 1999.
- [2] M. T. Swulius and M. N. Waxham. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65:2637, 2008.
- [3] G. Burnett and E. P. Kennedy. The enzymatic phosphorylation of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 211:969–980, 1954.
- [4] D. R. Knighton, J.H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 253:407–414, 1991.
- [5] A.C. Nairn and H.C. Palfrey. Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *Journal of Biological Chemistry*, 262:17299–17303, 1987.
- [6] M. Kukimoto-Niino, S. Yoshikawa, T. Takagi, N. Ohsawa, Y. Tomabechi, T. Terada, M. Shirouzu, A. Suzuki, S. Lee, T. Yamauchi, et al. Crystal structure of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase in complex with the inhibitor STO-609. *Journal of Biological Chemistry*, 286:22570–22579, 2011.
- [7] R.M. Counago, D. Dewry, C. Bountra, P. Arruda, A.M. Edwards, O. Gileadi, and Structural Genomics Consortium (SGC). Crystal structure of the human CaMKK2B. <https://www.rcsb.org/structure/5UY6>. (cit. 21.5.2018).
- [8] H. Tokumitsu, G. A. Wayman, M. Muramatsu, and T. R. Soderling. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase: identification of regulatory domains. *Biochemistry*, 36:12823–12827, 1997.
- [9] T. R. Soderling. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends in biochemical sciences*, 24:232–236, 1999.
- [10] L. Racioppi and A. R. Means. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *Journal of Biological Chemistry*, 287:31658–31665, 2012.
- [11] J. A Adams. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical reviews*, 101:2271–2290, 2001.
- [12] S.S. Taylor, J. Yang, J. Wu, N.M. Haste, E. Radzio-Andzelm, and G. Anand. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1697:259–269, 2004.
- [13] H. Tokumitsu, H. Enslen, and T. R. Soderling. Characterization of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 270:19320–19324, 1995.
- [14] M. Osawa, H. Tokumitsu, M. B. Swindells, H. Kurihara, M. Orita, T. Shibamura, T. Furuya, and M. Ikura. A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase. *Nature Structural and Molecular Biology*, 6:819, 1999.

- [15] H. Tokumitsu, M. Iwabu, Y. Ishikawa, and R. Kobayashi. Differential regulatory mechanism of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms. *Biochemistry*, 40:13925–13932, 2001.
- [16] R. L. Hurley, K. A. Anderson, J. M. Franzone, B. E. Kemp, A. R. Means, and L.A. Witters. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 280:29060–29066, 2005.
- [17] M. F. Green, J. W. Scott, R. Steel, J. S. Oakhill, B. E. Kemp, and A. R. Means. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β is regulated by multisite phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 286:28066–28079, 2011.
- [18] J. C. Lee and A. M. Edelman. A protein activator of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase Ia. *Journal of Biological Chemistry*, 269:2158–2164, 1994.
- [19] H. Tokumitsu, D. A. Brickey, J. Glod, H. Hidaka, J. Sikela, and T. R. Soderling. Activation mechanisms for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM-kinase IV. *Journal of Biological Chemistry*, 269:28640–28647, 1994.
- [20] R. K. Murray. *Harperova biochemie*, kap. 44: Působení hormonů. H+H, 2002.
- [21] K. P. Hoefflich and M. Ikura. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, 108:739–742, 2002.
- [22] A. Persechini and P. M. Stemmer. Calmodulin is a limiting factor in the cell. *Trends in cardiovascular medicine*, 12:32–37, 2002.
- [23] S.T. Rao, S. Wu, K.A. Satyshur, M. Sundaralingam, K.Y. Ling, and C. Kung. Structure of paramecium tetraurelia calmodulin at 1.8 Å resolution. *Protein Science*, 2:436–447, 1993.
- [24] K. A. Anderson, R. L. Means, Q. Huang, B. E. Kemp, E. G. Goldstein, M. A. Selbert, A. M. Edelman, R. T. Fremeau, and A. R. Means. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β . *Journal of Biological Chemistry*, 273:31880–31889, 1998.
- [25] S. A. Hawley, D. A. Pan, K. J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A. M. Edelman, B. G. Frenguelli, and D. G. Hardie. Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 2:9–19, 2005.
- [26] J. Robison and R. J. Colbran. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases. 2004.
- [27] H. Sakagami and H. Kondo. Cloning and sequencing of a gene encoding the β polypeptide of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV and its expression confined to the mature cerebellar granule cells. *Molecular brain research*, 19:215–218, 1993.
- [28] R. S. Westphal, K. A. Anderson, A. R. Means, and B. E. Wadzinski. A signaling complex of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A. *Science*, 280:1258–1261, 1998.
- [29] H. Enslen, P. Sun, D. Brickey, S.H. Soderling, E. Klamo, and T. R. Soderling. Characterization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. role in transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 269:15520–15527, 1994.

- [30] C. K. Miranti, D. D. Ginty, G. Huang, T. Chatila, and M. E. Greenberg. Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras-and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase. *Molecular and cellular biology*, 15:3672–3684, 1995.
- [31] E. A. Miska, E. Langley, D. Wolf, C. Karlsson, J. Pines, and T. Kouzarides. Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation. *Nucleic acids research*, 29:3439–3447, 2001.
- [32] F. A. Chow, K. A. Anderson, P. K. Noeldner, and A. R. Means. The autonomous activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is required for its role in transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 280:20530–20538, 2005.
- [33] T. R. Soderling and J. T. Stull. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chemical reviews*, 101:2341–2352, 2001.
- [34] K. Michaelsen and C. Lohmann. Calcium dynamics at developing synapses: mechanisms and functions. *European Journal of Neuroscience*, 32:218–223, 2010.
- [35] M. Peters, K. Mizuno, L. Ris, M. Angelo, E. Godaux, and K. P. Giese. Loss of Ca^{2+} /calmodulin kinase kinase β affects the formation of some, but not all, types of hippocampus-dependent long-term memory. *Journal of Neuroscience*, 23:9752–9760, 2003.
- [36] K. Mizuno, A. Antunes-Martins, L. Ris, M. Peters, E. Godaux, and K.P. Giese. Calcium/calmodulin kinase kinase β has a male-specific role in memory formation. *Neuroscience*, 145:393–402, 2007.
- [37] I. Morgado-Bernal. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience*, 176:12–19, 2011.
- [38] J. R. Hughes. Post-tetanic potentiation. *Physiological reviews*, 38:91–113, 1958.
- [39] W. Cao, M. Sohail, G. Liu, G. A. Koumbadinga, V. G. Lobo, and J. Xie. Differential effects of PKA-controlled CaMKK2 variants on neuronal differentiation. *RNA biology*, 8:1061–1072, 2011.
- [40] G.J. Morton, D.E. Cummings, D.G. Baskin, G.S. Barsh, and M.W. Schwartz. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443:289, 2006.
- [41] U. Andersson, K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling, and C. J. Small. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *Journal of Biological Chemistry*, 279:12005–12008, 2004.
- [42] J. Vinet, S. Carra, J.M.C. Blom, M. Harvey, N. Brunello, N. Barden, and F. Tascadda. Cloning of mouse Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta (CaMKK β) and characterization of CaMKK β and CaMKK α distribution in the adult mouse brain. *Molecular brain research*, 111:216–221, 2003.
- [43] F. Lin, T. J. Ribar, and A. R. Means. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase, CaMKK2, inhibits preadipocyte differentiation. *Endocrinology*, 152:3668–3679, 2011.
- [44] D. Metcalf. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells*, 25:2390–2395, 2007.

- [45] E. C. Teng, L. Racioppi, and A.R. Means. A cell-intrinsic role for camkk2 in granulocyte lineage commitment and differentiation. *Journal of leukocyte biology*, 90:897–909, 2011.
- [46] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, kap. 1.1. Springer Science+Business Media, New York, 2006.
- [47] Alfred D. Bacher. <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/Specialtopics/fluorescence.html>, 2016. (cit. 23.5.2018).
- [48] P. Atkins and J. de Paula. *Fyzikální chemie*, kap. 13.1: Introduction to fluorescence. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2013.
- [49] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, kap. 16: Protein fluorescence. Springer Science+Business Media, New York, 2006.
- [50] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, kap. 8: Quenching of fluorescence. Springer Science+Business Media, New York, 2006.
- [51] M. Kacirova, D. Kosek, A. Kadek, P. Man, J. Vecer, P. Herman, V. Obsilova, and T. Obsil. Structural characterization of phosducin and its complex with the 14-3-3 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 290:16246–16260, 2015.